

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Determinação de compostos bioativos e atividades biológicas,
de extratos aquosos de folhas de *Actinidia deliciosa*.**

Joana Filipa Silvério Henriques

Mestrado em Química
Química

Dissertação orientada por:
Maria Luísa Serralheiro
Maria Helena Florêncio

Agradecimentos

Desde já gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Dr.^a Maria Luísa Serralheiro e Dr.^a Maria Helena Florêncio por toda a orientação e transmissão de conhecimentos, simpatia, ajuda e disponibilidade que me foi prestada ao longo da realização deste trabalho.

Um muito obrigado aos meus colegas de Laboratório, Ana Assunção, André Filipe, Elsa Brito, Joana Peres, Laura Guedes e ao Luís Gomes por todo o apoio prestado durante estes meses, e por terem tornado os dias no laboratório muito mais fáceis e sempre com boa disposição. Também gostaria de agradecer, à professora Rita Pacheco pela ajuda, disponibilidade e por todos os conhecimentos que me passou no decorrer do trabalho.

Um obrigado, à professora Maria Helena Mendonça por ter disponibilizado as folhas de *Actinidia deliciosa*.

Agradeço do fundo do coração à minha família, mas em especial à minha Mãe e à minha Avó pela demonstração de confiança, por terem acreditado sempre nas minhas capacidades, e por todo o apoio que me prestaram durante estes meses que me deu muita força para continuar e fazer o meu melhor.

Um muito obrigado aos meus amigos, em especial ao Luís Almeida e à Teresa Gonçalves pelo apoio, compreensão e por acreditarem em mim.

A todos, obrigada!

Resumo

Na agricultura a poda de árvores e arbustos origina uma grande quantidade de detritos, que não são, na grande maioria das vezes, utilizados de forma mais eficiente pela indústria. Muitos destes detritos, principalmente as folhas, são ricas em compostos fenólicos, os quais conferem à planta proteção contra, a radiação ultravioleta e o ataque por agentes patogénicos, mas além disso são compostos que apresentam atividades biológicas muito interessantes, para a saúde humana e animal, como antioxidante, antiinflamatória, entre outras.

A poda da *Actinidia deliciosa* decorre durante o mês de dezembro e deste processo resultam enormíssimas quantidades de folhas que são, hoje em dia, desvalorizadas pela indústria. Um dos objetivos deste trabalho passou por caracterizar extratos das folhas de *Actinidia deliciosa*. No entanto, a caracterização do extrato de *Actinidia deliciosa* não foi desenvolvido somente para folhas recolhidas durante a poda, em dezembro, mas também para folhas de *Actinidia deliciosa* recolhidas em diferentes estágios de desenvolvimento.

Inicialmente através de um processo de decocção, foram preparados extratos aquosos de folhas da *Actinidia deliciosa*, recolhidas em diferentes períodos de desenvolvimento, entre os quais, no aparecimento das primeiras folhas (abril de 2014), na frutificação (setembro a novembro de 2015) e no período de poda da planta (dezembro de 2015). Para os diferentes extratos de *Actinidia deliciosa*, foram quantificados os seus conteúdos em fenóis totais, taninos, açúcares redutores, proteínas e mucilagem. O extrato de dezembro de *Actinidia deliciosa* foi o que revelou maior conteúdo em fenóis totais, taninos e proteínas. O extrato de abril foi o que demonstrou maior conteúdo em mucilagem e o extrato de novembro em açúcares redutores.

Para tentar obter um extrato mais concentrado em compostos fenólicos, foram aplicados diferentes métodos de purificação, usando cromatografia de fase reversa (extração em fase sólida, SPE, e recolha de frações por HPLC) e precipitação de mucilagens com etanol. Estes métodos foram aplicados com o intuito de eliminar interferentes, presentes na matriz e com isso concentrar os compostos fenólicos por miligrama de extrato. Para cada método foi determinado o conteúdo em fenóis totais, taninos e avaliada a atividade antioxidante de cada uma das frações fenólicas resultantes. Dos três métodos, a precipitação de mucilagens com etanol, foi o que demonstrou melhores resultados, mostrando ser um método muito promissor, já que ao contrário dos outros dois métodos, é mais económico e permite tratar grandes volumes de amostra. As mucilagens resultantes da precipitação com etanol foram analisadas por FTIR.

A identificação de compostos bioativos por HPLC e LC-MSⁿ, dos extratos aquosos de *Actinidia deliciosa*, revelou a presença de derivados de quercetina, proantocianidinas (B e C), ácido quínico, miricitrina, e ácido triterpénico-O-hexósido. O conteúdo em rutina e quercitrina (derivados de quercetina) foi quantificado para os vários extratos de *Actinidia deliciosa*.

As atividades biológicas foram desenvolvidas para o extrato de dezembro (extrato com maior conteúdo em compostos fenólicos) e para a fração fenólica resultante da precipitação das mucilagens. Foram avaliadas as atividades antioxidantes e anti-acetilcolinesterase, e os resultados adquiridos revelaram ser muito promissores, com valores de IC₅₀ e EC₅₀ baixos, para a inibição da enzima acetilcolinesterase (794 µg/mL e 567 µg/mL, para o extrato e fração purificada, respetivamente), e para a atividade antioxidante, quer no sequestro de radicais livres (DPPH: 12,8 µg/mL e 9,4 µg/mL, para o extrato e fração purificada, respetivamente; radicais de óxido nítrico: 449,4 µg/mL e 81 µg/mL, para o extrato e fração purificada, respetivamente) quer na inibição da peroxidação lipídica (330,8 µg/mL e 152,5 µg/mL, para o extrato e fração purificada, respetivamente).

Para os ensaios em linhas celulares Caco-2 foram analisadas duas amostras: o extrato de *Actinidia deliciosa* e a fração fenólica resultante da precipitação das mucilagens. Os ensaios em Caco-2 permitiram avaliar a citotoxicidade, das amostras e a permeação da rutina e quercitrina, nas células do intestino. Os resultados demonstraram que, tanto o extrato de *Actinidia deliciosa*, como a fração fenólica não são citotóxicos, e a permeação da rutina e da quercitrina, apresentaram valores satisfatórios, no entanto a permeação da rutina e da quercitrina foi relativamente maior no extrato (10 % e 5 %, para o extrato e fração purificada, respetivamente), demonstrando que a presença de mucilagens poderá ter um papel importante na permeação destes compostos. Foi também desenvolvida uma análise eletroforética para avaliar, até que ponto a presença de mucilagens no extrato influenciaria a expressão proteica no citosol das células, após o processo de permeação. Os resultados revelaram que, as células que estiveram em contato com a fração fenólica (sem mucilagens) viram a sua expressão proteica alterada.

Os resultados adquiridos ao longo deste trabalho revelam que, as folhas resultantes da poda de *Actinidia deliciosa* podem ser aproveitadas pela indústria farmacêutica/alimentar como fonte de compostos bioativos.

Palavras-chave: Folha de *Actinidia deliciosa*, compostos fenólicos, atividades biológicas, LC-MSⁿ, permeação.

Abstract

Pruning trees and shrubs in agriculture results in a large amount of debris, which are not, in most cases, used more efficiently by the industry. Many of these debris, especially the leaves, are rich in phenolic compounds, which give the plant protection against ultraviolet radiation and action of pathogens. Additionally, these phenolic compounds exhibit very interesting biological activities, for human and animal health, such as antioxidant anti-inflammatory, among others. By their inherent biological activity, they can be applied in several areas.

The pruning of *Actinidia deliciosa* takes place during the month of December, and this process produces huge amounts of leaves that are devalued by the industry. One of the objectives of this study, underwent characterize extracts from *Actinidia deliciosa* leaves. However, the characterization of *Actinidia deliciosa* extract was not developed only for leaves collected during pruning in December, but also *Actinidia deliciosa* leaves collected at different stages of development.

Initially through a decoction process, were prepared aqueous extracts of *Actinidia deliciosa* leaves, collected at different stages of development, including in the appearance of the first leaves (April 2014), the fruiting (September to November 2015) and in plant pruning period (December 2015). For different *Actinidia deliciosa* extracts its contents were quantified in total phenols, tannins, reducing sugars, proteins and mucilage. The December, *Actinidia deliciosa* extract had the highest content in total phenols, tannins and proteins. The extract of April showed higher content in mucilage and November extract in reducing sugars.

To try to get a more concentrated extract in phenolics purification methods were applied, using reverse phase chromatography (solid phase extraction, SPE, and collecting fractions by HPLC) and mucilage's precipitation with ethanol. These methods have been applied to eliminate interferences that may be present in the matrix, and thereby concentrate phenolic per milligram of extract. For each method, the content in total phenols and tannins was determined, and the antioxidant activity of each of the resulting phenolic fractions was evaluated. Of the three methods, mucilage precipitation with ethanol, demonstrated the best results, showing to be a very promising method, since unlike the other two methods, this is more economical and allows large volumes of sample to be handled. The mucilage of the resulting ethanol precipitation was analyzed by FTIR.

The identification of bioactive compounds by HPLC and LC-MSⁿ, of *Actinidia deliciosa* aqueous extracts, revealed the presence of derivatives of quercetin, proanthocyanidins (B and

C), quinic acid, myricitrin and triterpen-O-hexoside acid. The content of quercetin and rutin (quercetin derivatives) were quantified for different *Actinidia deliciosa* extracts.

The biological activities have been developed to extract December (extract with a higher content of phenolics), and the resulting phenolic fraction of mucilage precipitation. The antioxidant activities and anti-acetylcholinesterase were evaluated, the results obtained was very promising, for antiacetylcholinesterase activity (794 µg/mL and 567 µg/mL, before and after purification, respectively), antioxidant activity as radical scavenger (DPPH: 12.8 µg/mL and 9.4 µg/mL, before and after purification, respectively; nitric oxide radicals: 449.4 µg/mL and 81 µg/mL, before and after purification, respectively) and preventing lipid peroxidation (330.8 µg/mL and 152.5 µg/mL, before and after purification, respectively).

For assays in cell lines Caco-2 two samples were analyzed: The *Actinidia deliciosa* extract and the resulting phenolic fraction of mucilage precipitation. The Caco-2 assays allows to evaluate the cytotoxicity of the samples, and the permeation of quercitrin and rutin in the intestinal cells. The results showed that both, *Actinidia deliciosa* extract, and phenolic fraction are not cytotoxic, and the permeation of rutin and quercitrin showed satisfactory values, when compared with the literature, however the permeation of rutin and quercitrin in the extract was relatively higher (10 % and 5 %, before and after purification, respectively), showing that the presence of mucilage in the extract can help permeation of rutin and quercitrin. The electrophoretic analysis, was also developed for understanding how the presence of mucilage in the extract, can influence the protein expression in the cytosol of the cell, after the process of permeation. The results revealed that protein expression, from cells that were in contact with the phenolic fraction (without mucilage) has changed.

The results obtained during this work show that the leaves resulting from *Actinidia deliciosa* pruning, can be used by the pharmaceutical/food industry as a source of bioactive compounds.

Keywords: *Actinidia deliciosa* leaf, phenolic compounds, biological activities, LC-MSⁿ, permeation.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Acetiltiocolina
BHA	Hidroxianisol butilado (<i>Butylated hydroxyanisole</i>)
BHT	Hidroxitolueno butilado (<i>Butylated hydroxytoluene</i>)
BSA	Albumina do soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
C18	Coluna de octadecilsilano
CI	Ionização química (<i>Chemical Ionization</i>)
CoA	Coenzima A
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (3,5-Dinitrosalicylic acid)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil (<i>2,2-diphenylpicrylhydrazyl</i>)
DTNB	5-5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenóico) (<i>5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>)
EC ₅₀	Concentração eficiente (<i>Efficient concentration</i>) correspondente a 50% de extinção do radical
EI	Ionização eletrônica (<i>Electron Ionization</i>)
ESI	Ionização por Eletrospray (<i>Electrospray Ionisation</i>)
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetum bovine serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FeCl ₃	Cloreto de ferro (III)
FTICR	Ressonância ciclônica de íões com transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Ácido clorídrico
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência, com detetor <i>diode array</i> (<i>High-performance liquid chromatography with diode array detector</i>)
HRF	Fissão do anel heterocíclico (<i>Heterocyclic ring fission</i>)
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

IC ₅₀	Concentração inibitória (<i>Inhibitory concentration</i>) correspondente a 50% de inibição
IV	Infravermelho
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianeto de potássio
KBr	Brometo de potássio
LC-ESI-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de ionização por electrospray (<i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i>)
LC-MS ⁿ	Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa tandem
MALDI	Ionização por desadsorção laser assistida por matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MDA	Malondialdeído
[M-H] ⁻	Molécula desprotonada
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
<i>m/z</i>	Razão entre a massa e a carga do ião
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido nítrico
P _{app}	Coefficiente de permeabilidade aparente
PG	Propilgalato (Propyl gallate)
RDA	Retro Diels-Alder
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
PBS	Tampão de sais de fosfatos (<i>Phosphates buffer solution</i>)
Pen-Strep	Penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL
R _f	Fator de retardação
RNA	ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNS	Espécies reativas de azoto (<i>Reactive nitrogen species</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamina com dodecil sulfato de sódio (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central

SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid-Phase Extraction</i>)
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric acid reactive substances)
TBHQ	terc-butil-hidroquinona (tert-Butylhydroquinone)
TEER	Resistência elétrica transepitelial (<i>Transepithelial electrical resistance</i>)
TOF	tempo de voo (<i>Time-of-flight</i>)
TRIS	<i>Tris</i> (hidroximetil)aminometano (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

Índice

Agradecimentos	I
Resumo.....	III
Abstract	V
Lista de Abreviaturas e Siglas	VII
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas.....	XIX
Capítulo I - Introdução	
1.1 Problemática	3
1.2 <i>Actinidia deliciosa</i>	4
1.3 Metabolismo Secundário	5
1.4 Compostos Fenólicos	6
1.4.1 Ácidos Fenólicos	8
1.4.2 Flavonoides	9
1.4.3 Taninos	10
1.4.4 Tocoferóis.....	12
1.5 Triterpenóides e Triterpenóides Pentacíclicos.....	13
1.6 Mucilagens	14
1.7 Atividades Biológicas.....	15
1.7.1 Acetilcolinesterase	15
1.7.1.1 Inibidores da Acetilcolinesterase e a Doença de Alzheimer	17
1.7.1.2 Inibidores da Acetilcolinesterase no Tratamento Distúrbios Gastrointestinais ...	19
1.7.2 Atividade Antioxidante.....	20
1.8. Biodisponibilidade e Permeação da Barreira Intestinal de Compostos Fenólicos	22
1.9 Espetrometria de Massa	23
1.9.1 Espectrómetro de massa.....	23
1.9.1.1 Princípios básicos da ionização por Electrospray (ESI).....	24
1.9.1.2 Analisador de Massa de Armadilha de Iões (Ion Trap)	26
1.10 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	27
1.10.1 Sistema HPLC e Processo Cromatográfico	27
1.11 Técnica Hifenada	30
1.11.1 LC-MS	30
1.12 Extração em Fase sólida (SPE)	30

1.13 FTIR.....	31
1.14 Eletroforese SDS-PAGE.....	32
Capítulo II – Objetivos	35
Capítulo III – Parte Experimental	
3.1 Reagentes.....	41
3.2 Linhas Celulares.....	41
3.3 Equipamento	42
3.4 Plano de Amostragem	43
3.5 Preparação da Amostra.....	43
3.6 Condições de Análise por HPLC-DAD	43
3.7 Condições de Análise LC-MS ⁿ	44
3.8 Purificação de Compostos Fenólicos.....	44
3.8.1 Extração em Fase Sólida (SPE).....	45
3.8.2 Recolha de Frações do HPLC	45
3.8.3 Precipitação de Mucilagens	46
3.9 Quantificação de Compostos bioativos.....	46
3.9.1 Determinação de Fenóis Totais.....	46
3.9.2 Determinação de Taninos	48
3.9.3 Determinação de Açúcares Redutores.....	49
3.9.4 Determinação de Proteínas.....	50
3.9.5 Quantificação e Análise por FTIR das Mucilagens.....	51
3.9.6 Quantificação de Rutina e Quercitrina.....	52
3.10 Atividades Biológicas.....	52
3.10.1 Atividade Antioxidante.....	52
3.10.1.1 Ensaio do DPPH	52
3.10.1.2 Inibição da Peroxidação Lipídica – Método dos TBARS	53
3.10.1.3 Atividade Sequestradora de Radicais de Óxido Nítrico.....	55
3.10.2 Inibição da Acetilcolinesterase.....	56
3.11 Ensaios em Linhas Celulares Caco-2.....	57
3.11.1 Determinação da Citotoxicidade nas Caco-2	57
3.11.2 Biodisponibilidade e Permeação da Barreira Intestinal	59
3.11.3 Análise Eletroforética (SDS-PAGE) de Proteínas Totais Após Ensaio de Permeação nas Caco-2.	61
3.12 Análise Estatística de Resultados	62

Capítulo IV – Apresentação e Discussão de Resultados

4.1 Quantificação de Metabolitos Presentes nos Extratos Aquosos de Folhas de <i>Actinidia deliciosa</i> Durante Diferentes Estágios de Desenvolvimento da Folha.....	65
4.1.1 Fenóis Totais.....	65
4.1.2 Taninos	66
4.1.3 Açúcares Redutores.....	67
4.1.4 Proteínas	68
4.1.5 Mucilagem.....	69
4.1.6 Análise Comparativa dos Diferentes Metabolitos Presentes nos Extratos Aquosos de Folhas de <i>Actinidia deliciosa</i>	69
4.2 Influência de Processos de Purificação, sobre a Composição Química do Extrato de <i>Actinidia deliciosa</i>	70
4.2.1 Estudo do Método de Purificação para o Extrato Aquoso de <i>Actinidia deliciosa</i> de abril.....	70
4.2.2 Estudo do Processo de Purificação por Precipitação com Etanol dos Diferentes Extratos de <i>Actinidia deliciosa</i>	76
4.3 Análise das Mucilagens por FTIR.....	83
4.4 Identificação de Compostos Bioativos Presentes na Decocção de <i>Actinidia deliciosa</i> por HPLC-DAD e LC-MS ⁿ	84
4.5 Quantificação de Rutina e Quercitrina.....	105
4.6 Atividade Antioxidante.....	106
4.6.1 Método do DPPH.....	107
4.6.2 Atividade Sequestradora de Radicais de Óxido Nítrico.....	108
4.6.3 Inibição da Peroxidação Lipídica – Método dos TBARS	109
4.7 Inibição da Acetilcolinesterase.....	110
4.8 Ensaios em Linhas Celulares Caco-2.....	111
4.8.1 Determinação da Citotoxicidade nas Linhas Celulares Caco-2	111
4.8.2 Biodisponibilidade e Permeação da Barreira Intestinal.....	111
4.8.3 Análise Eletroforética (SDS-PAGE) de Proteínas Totais após Ensaio de Permeação nas Caco-2.....	113
Capítulo V – Conclusão e Perspetivas Futuras	119
Capítulo VI – Referências	69

Índice de Figuras

Figura 1: (a) <i>Actinidia deliciosa</i> ^[9] ; (b) <i>Actinidia chinensis</i> ^[10] ; (c) <i>Actinidia arguta</i> ^[11]	4
Figura 2: Folha de <i>Actinidia deliciosa</i> ^[20]	5
Figura 3: Formação do 4-cumaril-CoA a partir do ácido chiquímico, precursor para a síntese de flavonoides - adaptado de [24], [25].....	7
Figura 4: Estrutura dos ácidos hidroxibenzóicos - adaptado de [28].....	8
Figura 5: Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos - adaptado de [28].....	8
Figura 6: (a) Ácido rosmarínico; (b) ácido clorogénico.	9
Figura 7: Estrutura geral de um flavonoide.....	9
Figura 8: Biossíntese dos diversos flavonoides ^[24]	10
Figura 9: (a) Quercetina; (b) luteolina; (c) apigenina.	10
Figura 10: Estrutura do galotanino ácido tânico (a) e do elagitanino punicalagina (b) ^[45]	11
Figura 11: Formação da antocianidina a partir da proantocianidina.....	12
Figura 12: Estrutura química da vitamina E - adaptado de [46].	13
Figura 13: Estruturas dos triterpenos pentacíclicos oleanano, ursano e lupano.....	14
Figura 14: Reação de biossíntese de acetilcolina (ACh) ^[59]	16
Figura 15: Hidrólise da ACh pela AChE ^[56]	16
Figura 16: Estruturas químicas dos inibidores dos colinesterases de primeira e segunda geração.....	17
Figura 17: Imagem resumo da fisiopatologia da doença de Alzheimer. Formação de placas amilóides e tranças neurofibrilares - adaptado de [65].....	18
Figura 18: Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.	22
Figura 19: Esquema dos principais componentes de um Espectrómetro de Massa.	24
Figura 20: Esquema do processo de ionização por Electrospray ^[91]	25
Figura 21: Esquema Ion Trap ^[95]	26
Figura 22: Sistema HPLC - adaptado de [97].....	28
Figura 23: Fase Reversa C18 ^[101]	28
Figura 24: Representação de um cromatograma ^[103]	29
Figura 25: Componentes de um espectrómetro de FTIR - adaptado de [116].	32
Figura 26: SDS-PAGE - adaptado de [118].....	33
Figura 27: Esquema da SPE desenvolvido neste trabalho - adaptado de [107].....	45
Figura 28: Reação do ácido gálico, composto fenólico, com o molibdénio, componente do reagente de Folin- Ciocalteu ^[124]	47

Figura 29: Esquema representativo da reação envolvida no método DNS - adaptado de [127].	49
Figura 30: D-glucose.....	50
Figura 31: Exemplos de interações do Coomassie com os resíduos de aminoácidos - adaptado de [133].	51
Figura 32: Representação esquemática da redução do radical livre DPPH [•] na presença de uma substância com propriedades antioxidantes - adaptado [135].	53
Figura 33: Reação para o ensaio de Ellman para determinar a atividade da enzima acetilcolinesterase - adaptado [38].	56
Figura 34: Reação de redução de MTT a formazan pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial - adaptado de [144].	58
Figura 35: Representação esquemática do princípio básico de um ensaio em <i>Transwell</i> [®] - adaptado de [86].	60
Figura 36: Conteúdo em fenóis totais dos diferentes extratos. Valores expressos em µg equiv. de ácido gálico/mg extrato. A, B, C, D e E são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.	66
Figura 37: Conteúdo em taninos dos diferentes extratos. Valores expressos em µg equiv. de ácido tânico/mg extrato. A, B, C, D e E são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.	67
Figura 38: Conteúdo em açúcares redutores dos diferentes extratos. Valores expressos em µg/mg extrato. A, B, C, D e E são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.	68
Figura 39: Conteúdo em proteínas para os diferentes extratos. Valores expressos em µg/mg extrato. A, B, C e D são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.	68
Figura 40: Conteúdo em mucilagem para os diferentes extratos. Valores expressos em µg/mg extrato. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.	69
Figura 41: Quantificação de fenóis totais e taninos para cada um dos métodos de purificação, fração 2 da SPE e da recolhida por HPLC, e sobrenadante da precipitação com etanol. Para os fenóis totais A, B, e C, e para os taninos D, E e F, são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.	71
Figura 42: RP-HPLC do extrato de abril inicial de <i>Actinidia deliciosa</i> (a) e frações obtidas para cada um dos processos de purificação, SPE: (b1) primeira fração, (b2) segunda fração; recolha de HPLC: (c1) primeira fração (c2) segunda fração; e precipitação com etanol: (d1) fase sólida precipitada (mucilagem), (d2) sobrenadante.	73

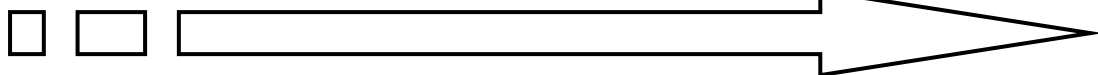
Figura 43: Valores de EC ₅₀ (µg/mL) para a atividade antioxidante, de acordo com o método do DPPH, para o extrato inicial de abril e para as frações fenólicas de cada um dos processos de purificação. A, B e C são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.....	75
Figura 44: Cromatograma (DAD) do extrato de setembro de 2015.....	76
Figura 45: Cromatograma (DAD) das mucilagens do extrato de setembro de 2015.	76
Figura 46: Cromatograma (DAD) do sobrenadante do extrato de setembro de 2015.	77
Figura 47: Cromatograma (DAD) do extrato de outubro de 2015.	78
Figura 48: Cromatograma (DAD) das mucilagens do extrato de outubro de 2015.	78
Figura 49: Cromatograma (DAD) do sobrenadante do extrato de outubro de 2015.	78
Figura 50: Cromatograma (DAD) do extrato de novembro de 2015.	79
Figura 51: Cromatograma (DAD) das mucilagens do extrato de novembro de 2015... ..	80
Figura 52: Cromatograma (DAD) do sobrenadante do extrato de novembro de 2015.	80
Figura 53: Cromatograma (DAD) do extrato de dezembro de 2015.....	81
Figura 54: Cromatograma (DAD) das mucilagens do extrato de dezembro de 2015.	81
Figura 55: Cromatograma (DAD) do sobrenadante do extrato de dezembro de 2015.	82
Figura 56: Espetro de FTIR para a mucilagem presente nas folhas de <i>Actinidia deliciosa</i>	83
Figura 57: Espetro LC-MS do pico 1 (tr: 3,33 minutos).	86
Figura 58: Espetro LC-MS/MS do pico 1 (tr: 3,33 minutos).	87
Figura 59: Via de fragmentação para a molécula de ácido quínico.	87
Figura 60: Espetro LC-MS do pico 2 (tr: 5,55 minutos).	88
Figura 61: Espetro LC-MS/MS do pico 2 (tr: 5,55 minutos).	88
Figura 62: Via de fragmentação da proantocianidina B - adaptado [165], [166].....	90
Figura 63: Espetro LC-MS do pico 3 (tr: 6,29 minutos).	91
Figura 64: Espetro LC-MS/MS do pico 3 (tr: 6,29 minutos).	91
Figura 65: Via de fragmentação da proantocianidina C – adaptado [165], [166].....	93
Figura 66: Espetro LC-MS do pico 4 (tr: 8,85 minutos).	93
Figura 67: Espetro LC-MS/MS do pico 4 (tr: 8,85 minutos).	94
Figura 68: Espetro LC-MS/MS/MS do pico 4 (tr: 8,85 minutos).....	95
Figura 69: Via de fragmentação da quercetina-3-O-rutinósido-7-O-glucósido.	96
Figura 70: Espetro LC-MS do pico 5 (tr: 9,28 minutos).	96
Figura 71: Espetro LC-MS/MS do pico 5 (tr: 9,28 minutos).	97
Figura 72: Via de fragmentação da quercetina-3-O-ramnósido-7-O-glucósido.....	97
Figura 73: Espetro LC-MS do pico 6 (tr: 12,67 minutos).	98
Figura 74: Espetro LC-MS/MS do pico 6 (tr: 12,67 minutos).	98
Figura 75: Via de fragmentação da miricitrina.....	99

Figura 76: Espetro LC-MS do pico 7 (tr: 13,3 minutos).	100
Figura 77: Espetro LC-MS/MS do pico 7 (tr: 13,3 minutos).	100
Figura 78: Via de fragmentação da rutina.....	101
Figura 79: Espetro LC-MS do pico 8 (tr: 14,6 minutos).	101
Figura 80: Espetro LC-MS/MS do pico 8 (tr: 14,6 minutos).	102
Figura 81: Via de fragmentação da quercitrina.....	102
Figura 82: Espetro LC-MS do pico 9 (tr: 16,11 minutos).	103
Figura 83: Espetro LC-MS/MS do pico 9 (tr: 16,11 minutos).	104
Figura 84: Espetro LC-MS/MS/MS do pico 9 (tr: 16,11 minutos).....	104
Figura 85: Via de fragmentação do ácido triterpénico- <i>O</i> -hexósido – adaptado [171].	105
Figura 86: Valores de EC ₅₀ (µg/mL) para a atividade antioxidante, de acordo com o método do DPPH, para o extrato de dezembro e respetivo sobrenadante, bem como para os padrões/antioxidantes comerciais. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.....	108
Figura 87: Valores de IC ₅₀ (µg/mL) para a atividade antioxidante, avaliando a capacidade captadora de radicais NO, do extrato de dezembro e respetivo sobrenadante, bem como para os padrões/antioxidantes comerciais. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.	109
Figura 88: Valores de IC ₅₀ (µg/mL) para a atividade antioxidante, ensaio dos TBARS, para o extrato de dezembro e respetivo sobrenadante, bem como para os padrões/antioxidantes comerciais. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.....	109
Figura 89: Eletroforama obtido da SDS-PAGE: (A) controlo, (B) extrato, (C) sobrenadante e (D) marcador de proteínas.....	114

Índice de Tabelas

Tabela 1: Programa do HPLC.	44
Tabela 2: Programa do LC.	44
Tabela 3: intensidades relativas de cada composto, para cada um dos métodos de purificação. ^a +++ três vezes mais concentrado, ++ duas vezes mais concentrado, + mais concentrado, – menos concentrado relativamente ao extrato inicial da <i>Actinidia deliciosa</i>	74
Tabela 4: Quantificação de fenóis totais (µg equiv. de ácido gálico/mg de extrato), taninos (µg equiv. ácido tânico/mg de extrato), e determinação de atividade antioxidante (µg/mL) para o sobrenadante e mucilagem, resultantes da precipitação do extrato de setembro de 2015.	77
Tabela 5: Fenóis totais (µg equiv. de ácido gálico/mg de extrato), taninos (µg equiv. ácido tânico/mg de extrato) e atividade antioxidante (µg/mL) para a solução de sobrenadante, mucilagem a partir do extrato de outubro de 2015.	79
Tabela 6: Fenóis totais (µg equiv. de ácido gálico/mg de extrato), taninos (µg equiv. de ácido tânico/mg de extrato) e atividade antioxidante (µg/mL) para a solução de sobrenadante, mucilagem a partir do extrato de novembro de 2015.	81
Tabela 7: Fenóis totais (µg equiv. de ácido gálico/mg de extrato), taninos (µg equiv. de ácido tânico/mg de extrato) e atividade antioxidante (µg/mL) para a solução de sobrenadante, mucilagem a partir do extrato de dezembro de 2015.	82
Tabela 8: Atribuição das bandas adquiridas do espectro de FTIR da mucilagem das folhas de <i>Actinidia deliciosa</i>	84
Tabela 9: Identificação de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de folhas de <i>Actinidia deliciosa</i>	85
Tabela 10: Conteúdo em rutina e quercitrina de cada extrato, antes (extrato inicial) e após precipitação de etanol (sobrenadante), Valores expressos em µg por mg de extrato.	106
Tabela 11: Valores de IC ₅₀ (µg/mL) para a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, para o extrato de dezembro e respetivo sobrenadante, bem como para os padrões de quercitrina e rutina.	110
Tabela 12: Toxicidade para o extrato e para o sobrenadante de outubro de 2015.	111
Tabela 13: Biodisponibilidade dos principais componentes (rutina e quercitrina) do extrato e sobrenadante de <i>Actinidia deliciosa</i> através das monocamadas Caco-2.	112
Tabela 14: Valores de R _f , logaritmo e respetivas massas moleculares relativas das proteínas do citosol das células em contato somente com o meio de cultura (controlo) (A), extrato (B) e sobrenadante (C). ^a bandas visíveis somente no sobrenadante.	115
Tabela 15: Percentagem de quercitrina e rutina presente no interior das células Caco-2 após ensaio de permeabilidade, das células em contato com o extrato e com o sobrenadante (resultante da precipitação de mucilagens).	116

Capítulo I - Introdução



1.1 Problemática

O processamento industrial de frutas e vegetais gera uma enormíssima quantidade de resíduos. A gestão e utilização destes subprodutos industriais, poderia ser feita de forma muito mais eficaz, ao contrário do que acontece na maioria das vezes, nos quais estes subprodutos não são aproveitados e passam a ser somente lixo industrial ^[1].

Inúmeros trabalhos científicos têm sido desenvolvidos sobre este tema, os quais têm vindo a demonstrar que, os subprodutos resultantes da indústria alimentar e cosmética são novas fontes ricas de compostos com atividades biológicas interessantes, como é o caso dos compostos fenólicos, que são os antioxidantes mais abundantes na dieta ^[1], ^[2]. O interesse nestes compostos aumentou consideravelmente nos últimos anos devido à sua capacidade antioxidante ^[3], e às suas implicações benéficas para a saúde humana, entre as quais, proteção contra o desenvolvimento do cancro, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e doenças neuro-degenerativas ^[2], ^[4].

Nos últimos anos também as mucilagens, estruturas polissacáridas, presentes nas folhas de várias plantas, têm sido empregues na indústria farmacêutica e alimentar, como excipientes e modificadores de textura, respetivamente. Estes polímeros naturais, pelas suas características têm conseguido fazer face ao uso de polímeros sintéticos ^[5]. O aumento, por parte da indústria farmacêutica e alimentar por estes polímeros naturais (mucilagem) e pelos compostos fenólicos, tem suscitado muito interesse por parte dos investigadores científicos.

A poda de árvores e arbustos na agricultura resulta numa grande quantidade de detritos que não são, na grande maioria das vezes, utilizados de forma mais eficiente. Muitos destes detritos, principalmente as folhas, são ricas em compostos fenólicos, os quais estão geralmente envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou a agressão por agentes patogénicos das plantas ^[4], ^[6]. Contudo, para além de desempenharem um papel muito importante na proteção das plantas, os compostos fenólicos também possuem atividades biológicas muito importantes para a saúde humana e animal, o que tem conduzido ao crescente da indústria farmacêutica e alimentar por estes compostos ^[7].

Na presente dissertação foi feita a caracterização de extratos de *Actinidia deliciosa*, recolhidas em diferentes estágios de desenvolvimento da folha. A caracterização foi feita consoante a composição em compostos bioativos, e atividades antioxidante e anticolinesterase desde o aparecimento das primeiras folhas (abril), fase de colheita do fruto (setembro, outubro, novembro) e a fase da poda (dezembro). A caracterização das folhas de

Actinidia deliciosa, recolhidas na altura da poda da planta, serviram para perceber se, as folhas teriam algum potencial biológico, que pudesse levar ao seu aproveitamento pela indústria.

1.2 *Actinidia deliciosa*

A planta *Actinidia deliciosa* Chevall., pertence à família das *Actinidiaceae*, e como todas as outras espécies pertencentes a esta família, são trepadeiras lenhosas, nativas do sul da China [8], [9]. Das quinze espécies de *Actinidia* que produzem frutos comestíveis, só três espécies têm atualmente importância comercial entre eles, *Actinidia deliciosa* (kiwi verde), *Actinidia chinensis* (kiwi amarelo) e *Actinidia arguta* (kiwiberry), contudo enquanto que as duas primeiras espécies já adquiriram grande importância comercial, no caso da *Actinidia arguta*, a sua comercialização ainda é consideravelmente recente (Figura 1). A espécie *Actinidia deliciosa* e *Actinidia chinensis* são bastante similares, e somente em 1984 foi descoberto, por Liang e Ferguson, que estes dois tipos de kiwi correspondiam a duas espécies diferentes [9].



Figura 1: (a) *Actinidia deliciosa* [9]; (b) *Actinidia chinensis* [10]; (c) *Actinidia arguta* [11]

Dos vários produtores de *Actinidia deliciosa*, destacam-se a Itália, Nova Zelândia, China e o Chile [9]. A sua introdução em Portugal é relativamente recente (anos 80). Rapidamente se tornou uma das principais culturas nas regiões de Entre Douro e Minho, e Beira Litoral (Noroeste de Portugal). Segundo o Instituto Nacional de Estatística, em 2013, a produção de *Actinidia deliciosa* em Portugal foi de 21 149 toneladas com uma área de produção de 2 117 hectares [12].

O cultivo de *Actinidia deliciosa*, é favorecido por a climas com elevada humidade relativa, com ausência de ventos fortes, frio invernal (dezembro a fevereiro) entre as 600 e 700 horas, e de geadas primaveris, os solos necessitam de estar bem drenados (a cultura exige 7 000 a 10 000 m³ de água por hectare) e ricos em matéria orgânica, tornando-se muito sensível a solos demasiados argilosos e calcários. [13], [14] A época de colheita e de comercialização do kiwi, em Portugal, são de outubro a novembro, e de outubro a maio, respetivamente [14].

O fruto de *Actinidia deliciosa* é uma fonte muito importante de vitamina A, C e E, potássio e compostos fenólicos, entre eles, flavonoides, como derivados de quercetina e canferol, e ácidos fenólicos como ácido 4-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido sirínico, ácido elágico, ácido gálico, e derivados do ácido cafeico, como o ácido clorogénico, entre outros [8], [15], [16]. Além de vitaminas, minerais e compostos fenólicos, também triterpenóides pentacíclicos, têm sido identificados no fruto de *Actinidia deliciosa*, entre eles, ácido 23-hidroxitormêntico, ácido asiático, ácido actinídico e ácido arjunólico, os triterpenóides atualmente também têm despertado muito interesse por parte dos investigadores, uma vez que possuem atividades biológicas muito interessantes [17].

Quanto à folha de *Actinidia deliciosa* (Figura 2), poucos estudos ainda foram desenvolvidos, muitos destes trabalhos referem que estas folhas são ricas em compostos fenólicos, os quais desempenham um papel importante na proteção da planta contra a agressão de agentes patogênicos [18]. Os compostos fenólicos que têm sido identificados na folha *Actinidia deliciosa* são essencialmente do tipo flavonoides, entre eles, derivados de quercetina e canferol [19].



Figura 2: Folha de *Actinidia deliciosa* [20].

1.3 Metabolismo Secundário

As plantas têm a importante capacidade de sintetizar uma grande diversidade de compostos de baixo peso molecular, denominados metabolitos secundários, os quais podem ou não, desempenhar um papel determinante no metabolismo vegetal. Os metabolitos secundários são compostos produzidos por algumas espécies e a sua concentração difere de planta para planta, ao contrário dos metabolitos primários como os glúcidos, as proteínas, clorofilas são encontrados em todas as plantas e desempenham funções metabólicas essenciais [21]. Os metabolitos secundários podem ser divididos em três grupos distintos: terpenóides, fenóis e alcalóides. Estudos demonstram que, muitos destes compostos possuem

atividades biológicas interessantes, tais como, atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígeno, antibacterianos e antivirais ^[22].

A composição de compostos fenólicos, metabolitos secundários, nas plantas é influenciada pela componente genética e pelo ambiente. Além da variedade genética, fatores ambientais, como a disponibilidade de água, composição do solo (teor de minerais), luminosidade, variações de temperatura, utilização de herbicidas, fertilizantes e pesticidas, podem afetar consideravelmente o conteúdo de compostos fenólicos na planta ^[23].

1.4 Compostos Fenólicos

Os fenóis abrangem um vasto conjunto de compostos, caracterizando-se por possuírem pelo menos um anel aromático, substituído por um ou mais grupos hidroxilo. Os compostos fenólicos presentes nas plantas, são maioritariamente biossintetizados pela via do ácido chiquímico ^{[24], [25]}.

O ácido chiquímico é precursor de uma grande variedade de metabolitos secundários que possuem na sua estrutura um anel aromático, e existe em relativa abundância, cerca de 10%, na estrela de anis ^[24]. A via do ácido chiquímico está envolvida na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos nas plantas, converte fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato resultantes da glicólise e da via da pentose fosfato, respetivamente, em aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano. A classe mais abundante de compostos fenólicos nas plantas resulta da fenilalanina, que é convertida em ácido cinâmico pela enzima fenilalanina amónia liase (PAL) (Figura 3). O ácido cinâmico é por sua vez, convertido em ácido *p*-cumárico. Este último também pode ser produzido diretamente a partir da tirosina, pela ação da enzima tirosina amónia liase (TAL). O ácido *p*-cumárico é então convertido em ácido cafeico, ou então pode também formar 4-cumarato, o qual posteriormente se liga à coenzima A (CoA) formando o 4-cumaril-CoA. O 4-cumaril-CoA vai servir de substrato à chalcona sintase, enzima chave na produção de flavonóides, isoflavonóides e taninos ^{[25], [26]}.

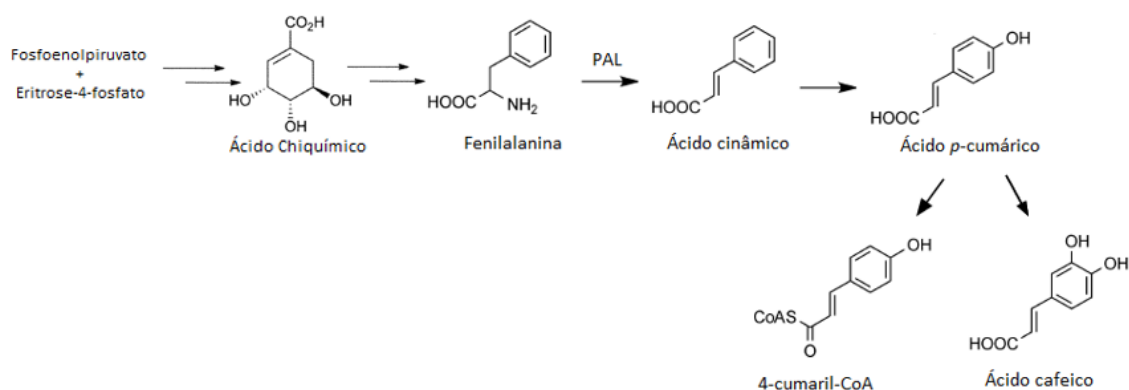


Figura 3: Formação do 4-cumaril-CoA a partir do ácido chiquímico, precursor para a síntese de flavonoides - adaptado de [24], [25].

Nas plantas existe uma enorme diversidade de compostos fenólicos (cerca de oito mil) [25]. Por norma estes compostos são classificados de acordo com a sua estrutura de origem, função biológica e natureza química. Estes subgrupos podem também diferir significativamente em termos de estabilidade, biodisponibilidade e funções fisiológicas relacionadas com a saúde humana [6]. Em alimentos, estes compostos podem contribuir para a cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa [4]. Nas plantas, os compostos fenólicos estão geralmente envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta, e contra a agressão por agentes patogénicos [4], [6].

Dos compostos fenólicos existentes na natureza destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos (derivado do ácido benzóico e cinâmico), taninos e tocoferóis (vitamina E), como antioxidantes fenólicos naturais mais comuns [27], [28]. Os compostos fenólicos englobam desde as moléculas mais simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicósidos) e proteínas [28].

A extração dos compostos fenólicos de resíduos alimentares e de plantas medicinais, por norma é feita com solventes orgânicos [29], micro-ondas [30], [31], [32], [33], ultra-sons [30], [31], fluídos supercríticos [32] ou através de sistemas aquosos de duas fases (ATPS) [34], [35]. Porém, têm sido desenvolvidos estudos nos quais a extração de compostos fenólicos de folhas de plantas medicinais, é feita com água, por infusão ou decocção, e a partir dos extratos aquosos resultantes, é feita a avaliação das atividades biológicas [36], [37]. Para a extração dos compostos bioativos das folhas de *Actinidia deliciosa*, o método utilizado foi uma decocção, porque para além de ser um método barato, é rápido, simples e consegue-se obter resultados bastante satisfatórios, como se verificou em estudos anteriores desenvolvidos para outras plantas [37].

1.4.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por apresentarem na sua estrutura um anel benzénico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo. Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico [28].

Nos ácidos hidroxibenzóicos (Figura 4) estão incluídos, o ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico e ácido sirínico, que têm uma estrutura comum, C₆-C₁ [28].

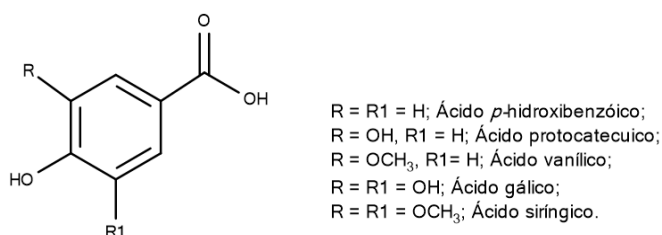


Figura 4: Estrutura dos ácidos hidroxibenzóicos - adaptado de [28].

Nos ácidos hidroxicinâmicos (Figura 5) estão incluídos, por exemplo, o ácido sináptico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico. Estão presentes nos tecidos vegetais principalmente na forma de ésteres e caracterizam-se por serem compostos aromáticos com uma cadeia lateral formada por três átomos de carbono (C₆-C₃) [28].

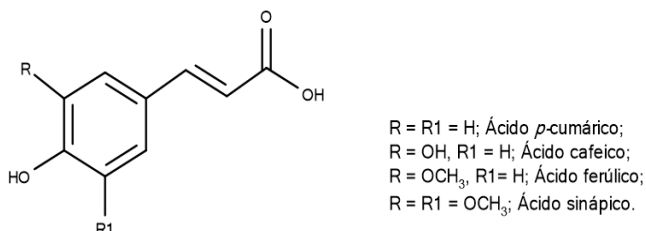


Figura 5: Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos - adaptado de [28].

Os ácidos sinápticos, ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido protocatecuico, sirínico e vanílico. Esta característica deve-se ao facto de os ácidos hidroxicinâmicos terem a dupla ligação fora do anel o que permite que haja estabilidade do radical por ressonância, já os derivados do ácido benzoico não apresentam essa característica [28].

Os ácidos fenólicos presentes em infusões de ervas, usadas na medicina tradicional, mais comuns são o ácido gálico (Figura 4) que resulta da hidrólise de taninos, derivados do ácido

hidroxicinâmico como ácido cinâmico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico (Figura 5) e ésteres do ácido cafeico como o ácido clorogénico e ácido rosmarínico (Figura 6) [38].

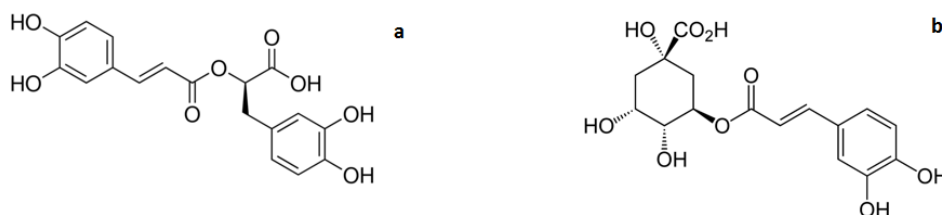


Figura 6: (a) Ácido rosmarínico; (b) ácido clorogénico.

1.4.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma grande família de metabolitos secundários, de baixo peso molecular [28], que têm em comum possuírem dois anéis aromáticos (A e B) unidos por uma cadeia de 3 átomos de carbono que pode, ou não, ter condensado num terceiro anel (C). O anel A possui um padrão de hidroxilação nas posições 5 e 7, e o anel B pode possuir um hidroxilo na posição 4', ou dois, nas posições em 3' e 4' ou três nas posições em 3', 4' e 5' (Figura 7) [24].

Variações na substituição do anel C, resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação [28].

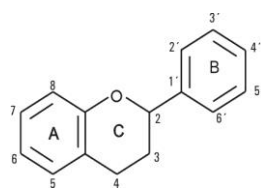


Figura 7: Estrutura geral de um flavonoide.

Do ponto de vista biossintético os flavonoides são formados pela união de duas subunidades, uma proveniente do ácido chiquímico, a partir da 4-cumaril-CoA (anel B e carbonos 2,3 e 4) (Figura 8) e outra da via do acetato (anel A) por condensação de três unidades de acetato através da via biossintético do ácido malónico. O 4-cumaril-CoA vai servir de substrato à chalcona sintase, enzima chave na produção de flavonoides, isoflavonoides e taninos [21].

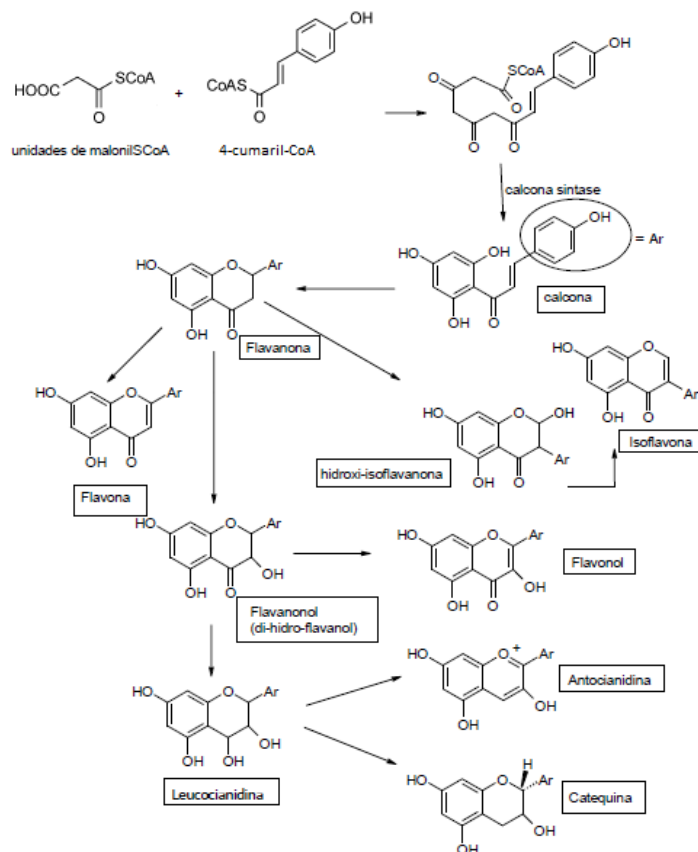


Figura 8: Biossíntese dos diversos flavonoides [24].

Os flavonoides presentes nas infusões de ervas, existem na sua maioria sob a forma glicosilada (com glucose, ramnose ou ácido glucorónico), apresentando grande solubilidade em água, no entanto alguns flavonoides não glicosilados podem também aparecer em extratos aquosos. O padrão de hidrolisação dos flavonoides é determinante para a sua identificação e propriedades. Os flavonoides mais comuns são a quercetina, apigenina e a luteolina (Figura 9) [39].

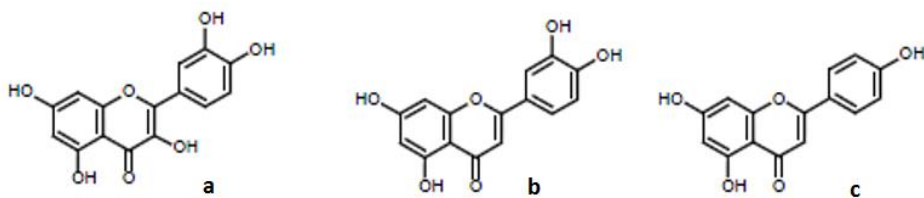


Figura 9: (a) Quercetina; (b) luteolina; (c) apigenina.

1.4.3 Taninos

Nos tecidos vegetais, alguns dos compostos fenólicos, não se apresentam na forma livre, mas sim sob a forma de polímeros, como é o caso dos taninos. Os taninos estão presentes na

maioria das plantas, e a sua concentração varia de acordo com a idade e tamanho da planta, época ou local de colheita ^[40].

Os taninos são compostos de elevado peso molecular entre 300 e 3000 Da ^[41], constituem uma classe de polifenóis que conferem ao alimento a sensação de adstringência, uma vez que têm grande capacidade de interagir com proteínas salivares originando complexos insolúveis ^[42]. De acordo com a sua estrutura química, os taninos, são classificados como taninos hidrolisáveis, taninos condensados e taninos complexos ^[28].

Os taninos hidrolisáveis são formados por ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir da via do ácido chiquímico, onde os grupos hidroxilo do açúcar (geralmente glucose) são esterificados com o ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitanino) (Figura 10) ^[28], ^[43], ^[44]. Na presença de certas enzimas, metais (como ferro, Fe^{2+} e Fe^{3+}) ou água quente, os taninos hidrolisáveis podem ser hidrolisados a componentes mais simples ^[44]. O ácido elágico é formado pelo acoplamento carbono-carbono de duas unidades de ácido gálico, seguida de lactonização espontânea ^[24].

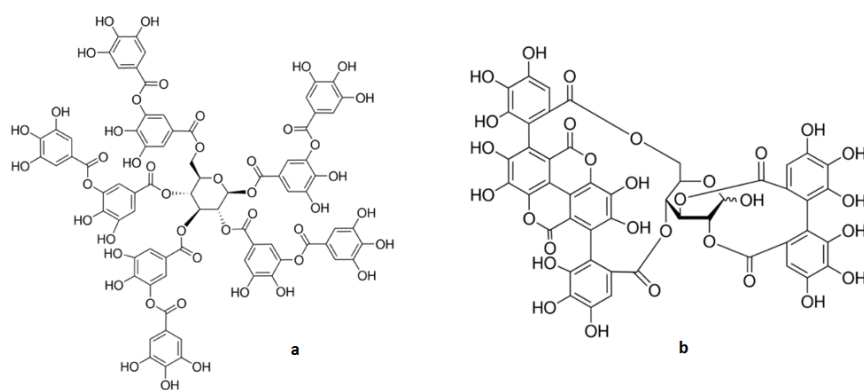


Figura 10: Estrutura do galotanino ácido tânico (a) e do elagitanino punicalagina (b) ^[45].

Os taninos condensados, denominados proantocianidinas, são oligómeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol ^[28], ^[44]. Quando formados por unidades de catequina, cada unidade de catequina está ligada entre si por ligações carbono-carbono, que se estabeleceram entre o carbono 4 de uma unidade e o carbono 8 de outra unidade de catequina. As proantocianidinas por cisão oxidativa (e não hidrólise) em álcool, a quente, dão origem às antocianidinas (Figura 11) ^[24].

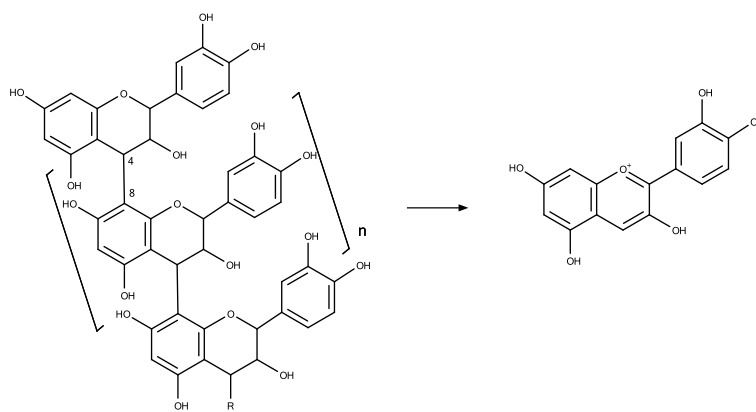


Figura 11: Formação da antocianidina a partir da proantocianidina.

Apesar de serem estas as duas classes principais de taninos, ainda existe outra classe designada de taninos complexos. Nos taninos complexos uma unidade de catequina está ligada por meio de um glicósido a unidades de galotaninos e/ou elagitaninos [24].

1.4.4 Tocoferóis

Os tocoferóis são compostos monofenólicos, existentes em vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas [28]. O termo genérico "vitamina E" é utilizado para designar oito compostos diferentes, nomeadamente α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis [46].

A nomenclatura desses compostos recebe o prefixo de α , β , γ , δ dependendo do número e posição do grupo metilo ligado ao anel aromático. A diferença entre tocoferóis e tocotrienóis, está relacionada com o tipo de ligações que são estabelecidas na cadeia lateral ligada ao anel. Quando a cadeia ligada ao anel apresenta ligações insaturadas, estamos na presença de tocotrienóis, quando se tem somente ligações simples na cadeia lateral designam-se de tocoferóis (Figura 12) [46]. Quanto à sua atividade biológica, funcionam como antioxidantes lipossolúveis e protegem as membranas celulares dos danos oxidativos [47].

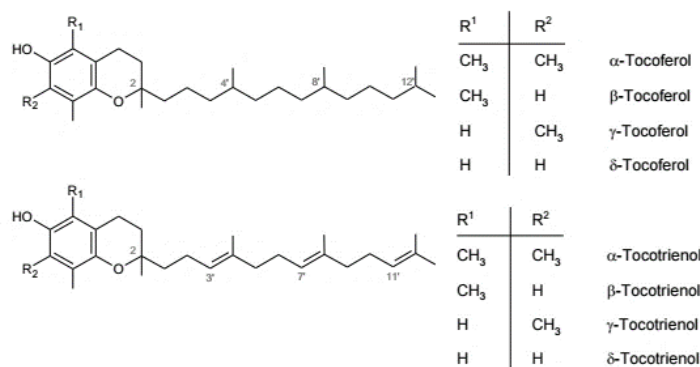


Figura 12: Estrutura química da vitamina E - adaptado de [46].

1.5 Triterpenóides e Triterpenóides Pentacíclicos

Os terpenos são constituídos por unidades isopreno (C₅), e de acordo com o número de unidades de isopreno, podem ser classificados como hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos ou carotenoides (C₄₀) e politerpenos (C_{5n}), podem apresentar esqueleto de carbono acíclico ou conter estruturas mono-, bi-, tri-, tetra- e pentacíclicas, respectivamente [48]. Quando os triterpenóides pentacíclicos (C₃₀H₄₈) estão glicosilados, são denominados de saponinas triterpénicas, sendo glicósidos, substâncias polares, as saponinas são geralmente solúveis em água e pouco solúveis em solventes apolares [49].

Frequentemente utilizados, para descrever o mesmo composto, os termos terpeno e terpenóide possuem uma diferenciação que é importante evidenciar. Enquanto que o primeiro é um termo coletivo indicado para descrever terpenos naturais, terpenóide inclui, igualmente, os produtos de degradação natural, bem como derivados naturais e sintéticos [48].

Os triterpenóides pentacíclicos, estruturas com trinta átomos de carbono e cinco anéis, podem ser divididos em três grandes grupos: oleananos, ursanos e lupanos (Figura 13). Os derivados de oleananos e ursanos apresentam na sua composição cinco anéis hexagonais, enquanto que os derivados de lupano, o quinto anel é pentagonal e os restantes quatro hexagonais [48].

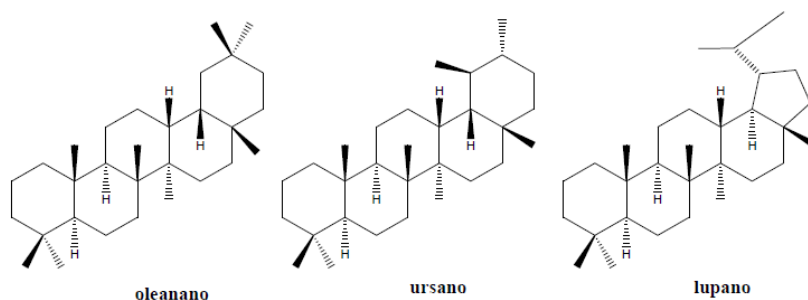


Figura 13: Estruturas dos triterpenos pentacíclicos oleanano, ursano e lupano.

Esta família de compostos também é constituída por ácidos, que podem ser encontrados em várias plantas e frutos, tais como o ursólico, asiático, corosólico, pomólico, tormêntico e madecássico (derivados ursano), o ácido oleanólico, maslínico e arjunólico (derivados oleanano) e o ácido betulínico (derivado lupano) ^{[50], [51]}, muitos destes compostos exibem atividades biológicas e farmacológicas interessantes, como atividade antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-HIV e cardiovascular, entre outras ^[50].

1.6 Mucilagens

As mucilagens são biopolímeros de elevado peso molecular, e podem ser encontradas em organismos de origem microbiana, animal ou vegetal. Estes biopolímeros são polissacáridos solúveis em água e, em alguns casos, são constituídos por proteínas ^[52]. Nos vegetais, as mucilagens são obtidas de sementes, folhas, frutos ou exsudados de plantas. Nas mucilagens as moléculas de água ligam-se aos grupos hidroxilo do núcleo polissacárido, resultando na hidratação da estrutura, permitindo que as plantas consigam armazenar grandes reservas de água, conseguindo resistir a condições de seca fisiológica ^[52]. O facto de as mucilagens apresentarem grande afinidade com água, podem formar géis ou soluções viscosas, dessa forma, tem crescido o interesse por parte da indústria farmacêutica e alimentar, para serem utilizadas como modificadores de textura, estabilizantes, emulsificantes e espessantes ^[53]. Além disso, estes polímeros naturais são económicos, não são tóxicos, são biodegradáveis e biocompatíveis para aplicações farmacêuticas. Um grande número de excipientes farmacêuticos à base de plantas, estão atualmente presentes no mercado ^[54]. Estes polímeros podem ser facilmente modificados, de modo a satisfazer as exigências da indústria farmacêutica e consequentemente, podem competir com os excipientes sintéticos, que ao contrário dos polímeros naturais, apresentam alguns inconvenientes, entre eles, o custo elevado de produção, toxicidade, efeitos secundários e não são renováveis nem biodegradáveis ^[5].

1.7 Atividades Biológicas

Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos inúmeros estudos sobre os compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas. A maioria das plantas é rica em compostos bioativos que conseguem melhorar a saúde humana através da sua ingestão. Atualmente são publicados cada vez mais estudos, que evidenciam as propriedades terapêuticas dos compostos fenólicos. Das diferentes propriedades que têm sido investigadas ganham destaque, a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e flavonoides, e a sua capacidade em inibirem a enzima acetilcolinesterase.

1.7.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima, pertencente à família das colinesterases ^[55], responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas, pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) ^[56]. A ACh é um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico (SNP) e também na junção neuromuscular. A ACh, os seus recetores e o conjunto enzimático responsável pela sua síntese e degradação, constituem o sistema colinérgico. O conhecimento deste sistema, principalmente das vias de sinalização celular que se iniciam pela ativação dos recetores colinérgicos, tem sido aplicado para o desenvolvimento de novos tratamentos para patologias neurológicas e psiquiátricas. Nestas patologias verifica-se uma disfunção do sistema de neuro-transmissão colinérgica, como por exemplo, transtornos de humor e alguns tipos de esquizofrenia ^{[56], [57]}.

No sistema nervoso periférico a AChE é responsável pela modulação dos impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, pela dilatação dos vasos sanguíneos e pela contração dos músculos lisos, já no sistema nervoso central está envolvida no processo cognitivo, controlo motor e na memória ^[56].

O neurotransmissor ACh é sintetizado na região terminal do axónio, a partir da colina e da acetilcoenzima A, numa única reação catalisada pela enzima colina-acetiltransferase (Figura 14) ^[58].

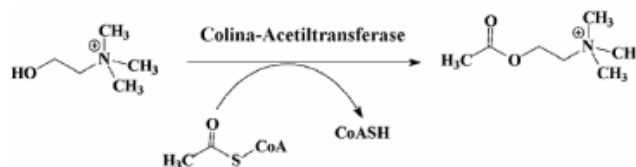


Figura 14: Reação de biossíntese de acetilcolina (ACh) ^[59].

Este neurotransmissor permanece armazenado em vesículas sinápticas e, quando um impulso nervoso chega ao terminal do axônio, é libertado por exocitose do neurónio pré-sináptico para a região sináptica, onde é então atraído pelos recetores colinérgicos que estão localizados na membrana do neurónio pós-sináptico. Quando a ACh interage com os recetores regenera o impulso nervoso no neurónio, levando assim à continuidade da transmissão. Uma vez transmitido o impulso nervoso, é importante que o processo de interação da ACh com o recetor seja interrompido, para evitar o excesso de transmissão nervosa, que pode levar ao mal funcionamento do organismo, para tal a acetilcolina move-se para o centro catalítico da AChE que está presente no neurónio pós-sináptico, onde se dá a hidrólise da acetilcolina, produzindo colina e ácido acético (Figura 15). A colina formada liga-se ao recetor do neurónio pré-sináptico, entra na célula para continuar o ciclo ^[58]. A AChE possui uma alta eficiência catalítica, com capacidade de hidrolisar até 6×10^5 moléculas de ACh por molécula de enzima por minuto ^[56].

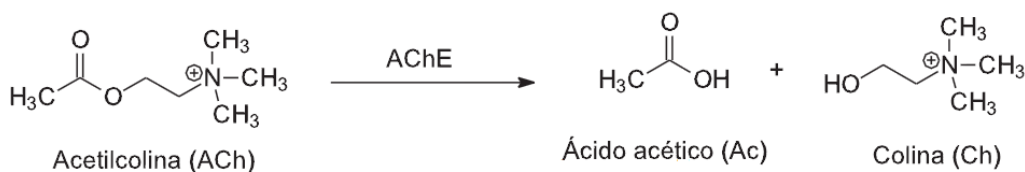


Figura 15: Hidrólise da ACh pela AChE ^[56].

Os inibidores de acetilcolinesterase podem ser utilizados no tratamento de algumas disfunções, tais como, a doença de Alzheimer e distúrbios gastrointestinais, já que estes inibidores permitem o aumento de acetilcolina nos níveis cerebrais e nas junções neuromusculares ^[36].

A primeira geração de inibidores da enzima acetilcolinesterase é representada pela tacrina, velnacrina e fisostigmina, dos quais somente a tacrina foi o primeiro dos inibidores da AChE a ser aprovado para o tratamento de Alzheimer em 1993, mas a sua utilização tem vindo a ser abandonada devido à elevada incidência de efeitos secundários, incluindo hepatotoxicidade ^[55], ^[56]. Começaram então a ser desenvolvidos novos compostos, que pudessem apresentar

menos efeitos colaterais e que fossem também mais específicos. Assim surgiu a segunda geração de inibidores dos colinesterases, que compreende o donepezil, metrifonato ^[60], a galantamina e a rivastigmina, entre outros (Figura 16) ^[61]. Os inibidores de segunda geração apresentam atividades inibitórias próximas das da tacrina, mas são clinicamente mais favoráveis no que toca aos efeitos colaterais ^[61]. No caso da galantamina, um alcaloide, descoberto na espécie *Galanthus*, é atualmente extraído a partir da espécie *Narcissus*, ^[62] ou sintetizado. A aplicação bem-sucedida da galantamina levou à pesquisa de novos inibidores da acetilcolinesterase, mais eficazes e com menos efeitos colaterais, em plantas utilizadas na medicina tradicional ^[55].

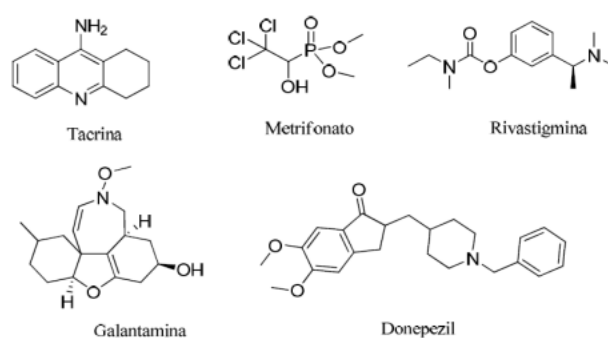


Figura 16: Estruturas químicas dos inibidores dos colinesterases de primeira e segunda geração.

1.7.1.1 Inibidores da Acetilcolinesterase e a Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é um tipo de demência que provoca uma deterioração global, progressiva e irreversível de diversas funções cognitivas (memória, atenção, concentração, linguagem, pensamento, entre outras) ^[63].

Do ponto visto bioquímico caracteriza-se pela presença de placas neuríticas amilóides extracelulares (deposição de β -amilóide) e tranças neurofibrilares (deposição de proteína tau fosforilada) (Figura 17) ^{[64], [65]}.

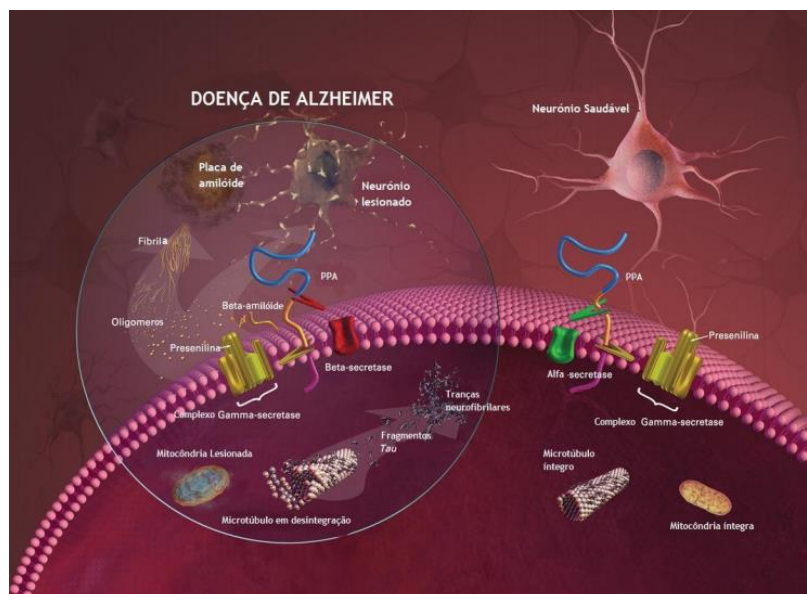


Figura 17: Imagem resumo da fisiopatologia da doença de Alzheimer. Formação de placas amilóides e tranças neurofibrilares - adaptado de [65].

Nos cérebros de indivíduos portadores de Alzheimer, o pequeno péptido β -amiloide resulta da clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) pelas enzimas β -secretase e γ -secretase, levando a formação de placas amiloides [66].

A proteína Tau é um dos componentes essenciais dos microtúbulos atuando na sua estruturação e estabilização. A capacidade de estabilizar os microtúbulos, integrantes fundamentais do citoesqueleto, essenciais para a manutenção da estrutura neuronal e o transporte axonal de diversas substâncias, incluindo os neurotransmissores, é determinada pelo grau de fosforilação da proteína Tau [67]. No sistema nervoso em desenvolvimento, a perda da estabilidade dos microtúbulos (pela hiperfosforilação) confere uma maior plasticidade celular e é essencial para o crescimento e diferenciação morfológica dos neurónios. Já num cérebro maduro, a manutenção da Tau com pouco grau de fosforilação, confere às células nervosas a estabilidade necessária para sua homeostase. Em portadores da doença de Alzheimer, verifica-se a perda de microtúbulos que conduzem a alterações estruturais e funcionais, levando à morte celular e à formação de tranças neurofibrilares. [65], [67]

Por todo o neocórtex são formadas tranças neurofibrilares, provocadas pela hiperfosforilação da Tau no meio intracelular, e depósitos insolúveis de amiloide que se foram acumulando extracelularmente [66]. De acordo com estudos recentes a proteína Tau fosforilada aparece primeiro que as acumulações de β -amiloide [68].

Dada a severidade da doença de Alzheimer e pelo facto de não haver cura, os fármacos existentes atualmente no mercado só mitigam os efeitos da doença, ou seja, tentam proporcionar a melhoria da qualidade de vida do doente, através do tratamento de alguns dos sintomas associados a esta doença. Alguns estudos que têm sido divulgados tratam da doença de Alzheimer a partir da modulação da atividade da enzima γ -secretase, responsável pela formação da β -amiloide, contudo a abordagem mais estudada, e utilizada nos dias de hoje passa pela administração de inibidores da atividade da acetilcolinesterase ^[69].

Doentes portadores da doença de Alzheimer demonstram possuir concentrações relativamente baixas de acetilcolina no cérebro ^{[70], [71]}. Assim a administração de inibidores de acetilcolinesterase tem demonstrado ser eficaz no tratamento sintomático de pacientes com Alzheimer, uma vez que se verifica um aumento dos níveis de acetilcolina ^{[71], [72]}.

Os três inibidores da acetilcolinesterase aprovados pela agência *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América para o tratamento da doença de Alzheimer são, donepezil (Aricept®), galantamina ^[62] (Reminyl®), rivastigmina (Exelon®) e ^[69] tacrina (THA, Cognex®) ^[56]. Todos estes fármacos são eficazes a retardar o processo neurodegenerativo nos doentes de Alzheimer. A tacrina, entretanto, tem uso limitado devido a hepatotoxicidade, levando os pacientes a descontinuarem o tratamento. Pelo facto das substâncias atualmente utilizadas para reduzir os sintomas causados pela doença de Alzheimer apresentarem efeitos colaterais, existe a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos ^[56].

1.7.1.2 Inibidores da Acetilcolinesterase no Tratamento Distúrbios Gastrointestinais

A parede intestinal é constituída por camadas de músculo, que contraem e relaxam de forma coordenada, impulsionando o alimento através do intestino para o ânus. Este padrão complexo de motilidade é coordenado por vias excitatórias e inibitórias do sistema nervoso entérico, no qual a acetilcolina é o principal neurotransmissor excitatório responsável pelas contrações peristálticas, sendo responsável por controlar o transporte iónico nas células do epitélio intestinal ^{[36], [73]}. Das várias condições médicas que podem estar associadas à fraca motilidade intestinal incluem dor abdominal, vômitos, prisão de ventre ^[36].

Para contornar o problema, podem ser utilizados inibidores da acetilcolinesterase para aumentar a motilidade intestinal, já que as pequenas contrações musculares que ocorrem ao longo do aparelho digestivo estão relacionadas com a libertação de acetilcolina. Inibindo a

hidrólise da acetilcolina, consegue-se aumentar as pequenas contrações da parede do tubo digestivo, aumentando assim a velocidade do trânsito gastro-intestinal. O inibidor da AChE, neostigmina é usado para tratar condições relacionadas com disfunções na motilidade gastrointestinal, tal como a pseudo-obstrução do cólon ^[74]. Outros inibidores da AChE também são utilizados para tratar as disfunções da motilidade gástrica, como a metoclopramida e a vinitidina ^[36].

Algumas das perturbações gastrointestinais estão relacionadas com a inflamação, tais como as doenças inflamatórias do intestino. A inflamação nesses casos está relacionada com espécies reativas de oxigénio e azoto (ROS e RNS), e, por conseguinte, o uso de compostos antioxidantes poderá ser útil ^[75].

1.7.2 Atividade Antioxidante

Os antioxidantes naturais, presentes em muitas plantas, atuam como resposta metabólica à produção endógena de radicais livres e outras espécies oxidantes. A resposta metabólica pode resultar do *stress* ecológico, ou pode ser promovida por toxinas produzidas por fungos patogénicos e bactérias. Recentemente, tem aumentado o interesse em antioxidantes de origem natural que podem ser aplicados na proteção do Homem contra danos resultantes do *stress* oxidativo ^[70].

O *stress* oxidativo, pode ser visto como resultado do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa (antioxidantes) do organismo. Existem cada vez mais evidências de que os radicais livres provocam alterações moleculares numa grande variedade de espécies moleculares, incluindo lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, e resultado dessas alterações, são associados a varias doenças, entre as quais cancro, arteriosclerose, doença de Alzheimer, asma, artrite, doenças cardiovasculares, envelhecimento, e têm um papel muito importante na deteriorização da comida ^{[7], [76]}. Radical livre pode ser definido como qualquer espécie molecular que contém um eletrão desemparelhado numa orbital atómica. A presença de um eletrão não emparelhado, faz com que estes radicais sejam instáveis e altamente reativos. Eles podem doar um eletrão ou aceitar um eletrão de outras moléculas, portanto, comportando-se como oxidantes ou redutores ^[7].

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são entidades químicas que incluem radicais de oxigénio tais como o anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) radicais hidroxilo ($\cdot OH$), e ainda espécies não radicalares como o oxigénio singuleto (1O_2) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Nem todas as espécies reativas existentes nas células são estritamente de oxigénio, algumas contêm

também azoto na sua composição – espécies reativas de azoto (RNS). À semelhança das ROS, estas espécies têm a capacidade de se difundir livremente nos sistemas de membrana celular. Nas RNS estão incluídas entidades químicas como radicais de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e dióxido de azoto ($\cdot\text{NO}_2$), e ainda espécies não radicalares como ácido nitroso (HNO_2) e tetróxido de diazoto (N_2O_4) ^[77]. Embora as ROS e RNS desempenhem um importante papel em muitos processos biológicos, a sobreprodução destas espécies pelas células pode resultar tanto de fontes endógenas como exógenas. As vias de metabolismo aeróbico, em que o oxigénio molecular (O_2) funciona como aceitador final de eletrões, inevitavelmente levam à produção de ROS, fazendo das mitocôndrias uma das fontes endógenas de produção de ROS de grande relevância. As fontes exógenas incluem agentes ambientais (fumo do tabaco, certos poluentes, solventes orgânicos ou pesticidas), metais (Fe e Cu) e radiação ^[78], que levam à oxidação de biomoléculas como lípidios, proteínas e DNA ^[79] no qual pode resultar em lesões teciduais (inflamações), morte celular, ou ainda processos degenerativos ^[7].

O excesso de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) levam ao desenvolvimento de lesões tecidulares, através da libertação de citocinas e ativação de enzimas como os lipoxigenases (LOX) a partir de células inflamatórias. Estas enzimas também desempenham um papel importante na inflamação, uma vez que estão envolvidos na biossíntese de mediadores lipídicos inflamatórios, tais como leucotrienos e prostaglandinas, e a sua inibição é considerada como um dos alvos para a prevenção de certas doenças associadas, cujo desenvolvimento está ligada ao *stress* oxidativo e à inflamação ^[79].

Um antioxidante, é uma molécula suficientemente estável para doar um eletrão a um radical livre neutralizando-o, e reduzindo assim a sua capacidade de provocar danos celulares. Assim, os antioxidantes conseguem atrasar ou inibir danos celulares, principalmente através das suas propriedades de eliminação de radicais livres. Alguns antioxidantes, como a glutatona, ubiquinol e ácido úrico, são produzidos durante o metabolismo normal do corpo ^[7].

Compostos antioxidantes conseguem inibir a iniciação ou a propagação das reações de oxidação lipídica. Atualmente as reações de oxidação lipídica são um mecanismo de lesão celular bem estabelecido em animais e plantas, e servem de indicador de *stress* oxidativo de células e tecidos ^[80]. A formação de lipoperóxidos resulta de um processo químico, em que os ácidos gordos insaturados são danificados por radicais livres e oxigénio ^[81]. Lipoperóxidos são instáveis e decompõem-se para formar uma vasta gama de compostos, especialmente certos aldeídos citotóxicos como o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) ^[80]. Compostos que apresentem atividade antioxidante, conseguem interromper a cadeia de peroxidação,

reagindo com os radicais peroxila ou alcóxila, conduzindo à formação de hidroperóxidos. A utilização de antioxidantes, pode minimizar a extensão da peroxidação lipídica [82].

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes, antioxidantes com atividade enzimática e antioxidantes sem atividade enzimática. Como antioxidantes enzimáticos têm-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Estas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicalares, protegendo as células e tecidos do *stress* oxidativo. Na segunda classe, estão incluídos compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos [83]. A atividade antioxidante, pode ser assim determinada a partir de vários testes *in vitro*, entre eles, testes químicos e testes enzimáticos. [28]

Antioxidantes sintéticos, como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propilgalato (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), são utilizados como aditivos alimentares (Figura 18) [16]. Antioxidantes naturais existem nas folhas, sementes, raízes e frutas da maioria das plantas. As plantas são a principal fonte de vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e compostos fenólicos. Estes são os captadores de radicais livres mais eficazes nos organismos vivos. Recentemente, a investigação por fontes antioxidantes naturais tem aumentado exponencialmente, e de acordo com estudos desenvolvidos em laboratório, demonstram ser mais seguros, e em alguns casos são mais eficientes do que os compostos sintéticos [16].

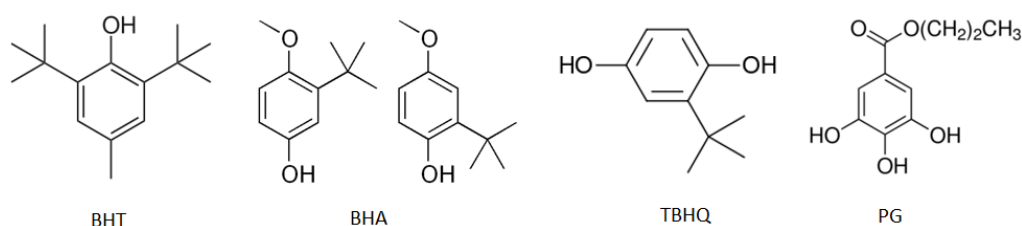


Figura 18: Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.

1.8. Biodisponibilidade e Permeação da Barreira Intestinal de Compostos Fenólicos

Atualmente têm-se vindo a denotar um crescente interesse por parte da indústria farmacêutica no desenvolvimento de sistemas de cultura celular, que sejam capazes de mimetizar a mucosa intestinal. As células epiteliais do intestino, são as células das vilosidades, totalmente diferenciadas, a partir das quais têm sido desenvolvidos inúmeros estudos para

avaliar a absorção e metabolismo de determinados compostos. Dessa forma, torna-se necessário desenvolver ensaios *in vitro* capazes de simular as condições verificadas *in vivo* para este tipo de transporte e absorção. O sistema de cultura de células *in vitro* consiste na formação de uma monocamada de células viáveis das vilosidades, polarizadas e totalmente diferenciadas, semelhante à encontrada no intestino delgado, que representa uma ferramenta valiosa no estudo de compostos, transporte de nutrientes e metabolismo ^[84].

Vários métodos *in vitro* são aceites pela FDA dos Estados Unidos, para a avaliação da permeabilidade e da absorção de determinados compostos. As células Caco-2 são considerados o sistema modelo para o estudo da permeabilidade intestinal, visto que a maioria dos fármacos são absorvidos pelo organismo principalmente via intestinal ^[84]. As células Caco-2 são as mais aconselháveis de usar nestes ensaios, pois são células de origem humana e podem ser facilmente manipuladas em culturas, de maneira a que exibam diversas características similares ao epitélio do intestino delgado humano ^{[85], [86]}.

1.9 Espetrometria de Massa

A espectrometria de massa é uma das mais importantes técnicas de análise estrutural da atualidade, devido à sua rapidez de análise, elevada sensibilidade, baixo limite de deteção (geralmente na ordem dos picogramas e picomoles) que tornam esta técnica bastante versátil e permitem a sua aplicabilidade nas mais diversas áreas da ciência, como química, biologia, ciências forenses, entre outras. Através da espectrometria de massa é possível determinar a massa molecular e quantificar moléculas e biomoléculas, através da sua ionização e fragmentação dos iões formados, de forma a elucidar a sua estrutura e confirmar a sua identificação ^[87].

1.9.1 Espectrómetro de massa

Um espectrómetro de massa moderno típico é composto essencialmente por cinco componentes (Figura 19):

- Sistema de introdução da amostra, por introdução direta ou introdução da amostra proveniente de um método separativo;
- Fonte de ionização que permite a ionização da amostra em fase gasosa;
- Analisador de massa que separa os iões consoante a sua razão massa/carga;
- Detetor no qual o fluxo de iões é convertido num sinal elétrico;

- Sistema de aquisição de dados que facilita a obtenção do espectro de massa, a partir do qual temos a abundância relativa dos iões que chegaram ao detetor em função da razão massa/carga.

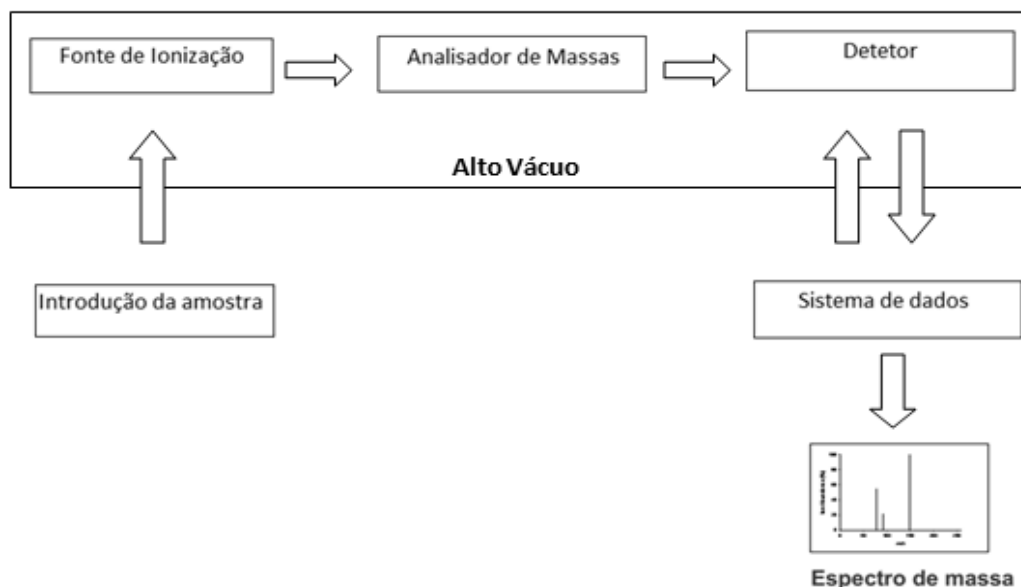


Figura 19: Esquema dos principais componentes de um Espectrómetro de Massa.

Todo o processo, desde a fonte de ionização até ao detetor, é realizado sob alto vácuo de modo a evitar colisões entre os iões e o gás de fundo, de forma a impossibilitar a ocorrência de reações ião-molécula.

De entre as técnicas de ionização, as mais comuns são a Ionização Eletrónica (EI), a Ionização Química (CI), a Ionização por desadsorção laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por electrospray (ESI) e os analisadores mais vulgares são o quadrupólo, a armadilha de iões (*ion trap*), o de tempo de voo (TOF) e ainda o de ressonância ciclotrónica de iões com transformada de Fourier (FTICR) ^[88]. Na presente dissertação, utilizou-se um espectrómetro de massa equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), um analisador de armadilha de iões (*ion trap*) e um multiplicador de eletrões como detetor. No multiplicador de eletrões onde a corrente iónica é multiplicada por aceleração de eletrões na superfície de um eléctrodo, originando eletrões secundários. Deste modo, é transmitido um sinal elétrico, que chega ao sistema de aquisição de dados que, por sua vez, o exhibe na forma de um espectro de massa ^[89].

1.9.1.1 Princípios básicos da ionização por Electrospray (ESI)

A ionização por electrospray (ESI) é uma das principais técnicas de ionização à pressão atmosférica, que permitiu expandir a análise de uma vasta gama de moléculas que podem ser

analisadas por espectrometria de massa, incluindo moléculas de elevada polaridade, elevada massa molecular, não voláteis e de grande complexidade estrutural. Esta técnica apresenta características que a tornam distinta das outras técnicas de ionização, como a capacidade para produzir iões multiplamente carregados (com número de cargas elevado) o que, uma vez que a sua razão massa carga é reduzida, possibilita a análise de compostos de massa molecular elevada, até centenas de kDa. Uma vez que as amostras são introduzidas em solução, possibilita o acoplamento com técnicas de separação, como por exemplo o HPLC e, visto ser uma técnica de ionização suave, a ESI permite que as interações não covalentes que existem na fase líquida sejam preservadas na fase gasosa [87].

O princípio de electrospray foi inicialmente descrito em 1968 por Dole e seus colaboradores, que consideraram a possibilidade de gerar iões provenientes de macromoléculas da fase líquida para a fase gasosa através da pulverização de uma solução contida na ponta de um capilar carregado eletricamente. A partir destes estudos, em 1988 John Fenn, que em 2002 seria consagrado com Prémio Nobel em Química, aplicando este princípio à espectrometria de massa [90]. Na Figura 20, encontra-se esquematizado o processo de electrospray.

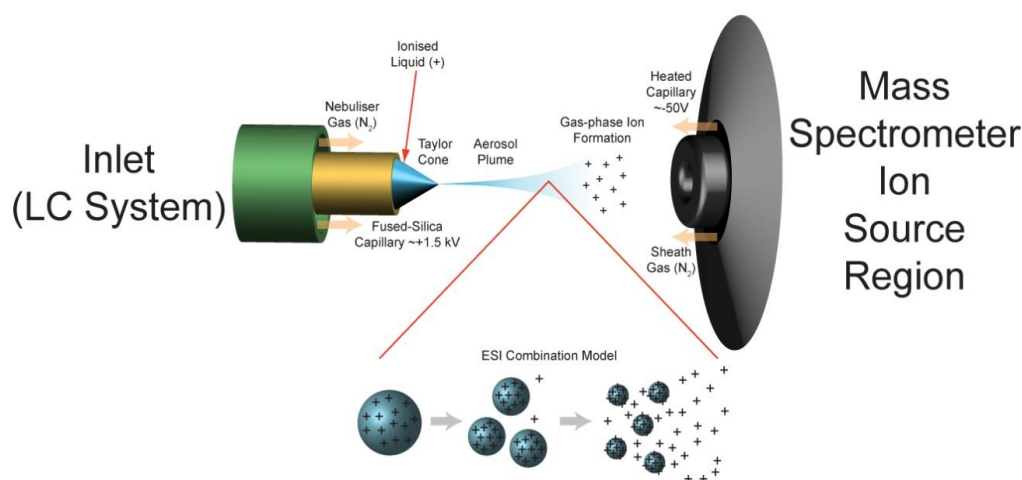


Figura 20: Esquema do processo de ionização por Electrospray [91].

No processo de ionização por ESI uma solução diluída do analito, é bombeada a um fluxo bastante baixo (0,1 - 10 $\mu\text{L}/\text{min}$) através de um capilar, ao qual foi aplicado uma voltagem (2-5kV) e, consoante o potencial aplicado, a carga das gotículas pode ser positiva ou negativa. Quando é aplicado, por exemplo, um potencial positivo, os iões positivos tendem a afastar-se para uma região menos positiva, ou seja, na direção do contra-elétron [92]. Assim, a gota que se forma na extremidade do capilar está enriquecida com iões positivos, e à medida que a densidade de carga na gota aumenta, o campo elétrico formado pelo capilar e contra elétron

aumenta, provocando a deformação da gota que se encontra na extremidade do capilar, adquirindo a forma de um cone que é conhecido por cone de Taylor, Figura 20. Quando as repulsões de Coloumb na superfície carregada superam a tensão superficial da solução, atinge-se o limite de Rayleigh, pelo que as gotas que contêm excesso de carga, positiva ou negativa, desprendem-se do capilar subdividindo-se sob a forma de um *spray*. Sucessivas divisões das gotículas com remoção de moléculas de solvente, potenciada pela interação com o gás contra corrente, geralmente azoto, levam à formação de iões não solvatados em fase gasosa [92], [93], [94]. Em seguida, através de um cone/orifício, os iões passam para uma zona intermédia mantida a uma pressão mais baixa e atravessam o *skimmer* em direção ao analisador de massa que se encontra a alto vácuo. No *skimmer* os iões mais leves (moléculas de gás e solvente) são bombeados enquanto que os iões da amostra passam através dele [92], [94].

1.9.1.2 Analisador de Massa de Armadilha de Iões (Ion Trap)

O analisador de armadilha de iões é composto por dois elétrodos *end cap*, com superfícies hiperbólicas, e por um elétrodo de anel central (Figura 21).

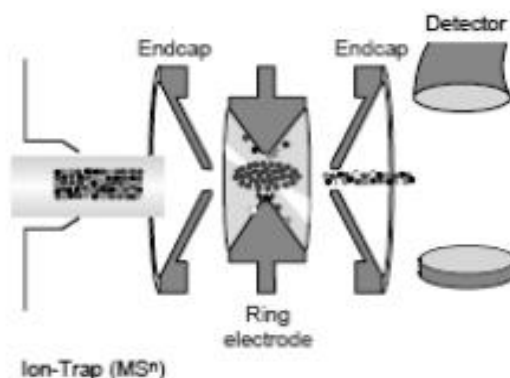


Figura 21: Esquema Ion Trap [95].

Além da elevada sensibilidade, uma das vantagens do analisador de armadilha de iões é que permite fazer experiências de espectrometria de massa tandem no tempo, isto é, os iões precursores são mantidos no interior da armadilha, enquanto os outros são ejetados. Os iões precursores são sujeitos a um campo de radiofrequências que os detêm numa posição estática no analisador (sistema de 3 elétrodos, dois *endcaps* e um elétrodo de anel central) e são então bombardeados com gás (normalmente Hélio) de forma a fragmentarem [96]. Os fragmentos resultantes são ejetados, por aplicação de voltagens nos elétrodos *endcap*, em direção ao detetor. A remoção dos iões indesejáveis é conseguida pela aplicação de voltagens que levem à sua colisão com as paredes do analisador [95], [96].

1.10 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O conceito de cromatografia líquida foi introduzido no início do século XX, quando em 1906 o botânico russo Mikhail Tswett desenvolveu a primeira coluna de cromatografia clássica, e demonstrou a sua capacidade de separar diferentes extratos de plantas. Na sua experiência, Tswett injetou um extrato de planta com éter de petróleo através de uma coluna de vidro com carbonato de cálcio como fase estacionária ^[97]. O seu trabalho, no entanto, não foi reconhecido durante duas décadas. No entanto no início dos anos 30 o trabalho foi redescoberto, estimulando o interesse de cientistas, e consequentemente o desenvolvimento de vários novos tipos de técnicas cromatográficas e suas aplicações.

Durante os anos 60, o sistema HPLC viria a ser desenvolvido por dois grupos de investigação diferentes, um deles sediado nos Estados Unidos sob a liderança de Csaba Horváth e o outro sediado na Europa sob liderança de Joseph Huber. Resultados dos trabalhos desenvolvidos por estes dois diferentes grupos foram descritos entre 1966 e 1968. A introdução no mercado de sistemas HPLC dá-se no fim dos anos 60 por via da Waters Associates e DuPont, sendo em 1971 publicado o primeiro livro sobre HPLC. ^[98]

1.10.1 Sistema HPLC e Processo Cromatográfico

A cromatografia de alta eficiência (HPLC) é uma técnica analítica que permite separar e analisar compostos (não voláteis e/ou termolábeis) em vários tipos de amostras, num intervalo de tempo relativamente curto, com alta resolução, eficiência e sensibilidade ^[98].

Um sistema HPLC (Figura 22) é usualmente constituído por um reservatório de solventes e sistemas de bombeamento, sistema de injeção da amostra, coluna de alta pressão, detetor e um computador com software de aquisição e processamento de dados. As colunas de HPLC são geralmente de aço inoxidável, de comprimento variável 10-30 cm, com diâmetro interno de 2-5mm, empacotadas com partículas de tamanho muito pequeno, 3-10 μm , que constituem a fase estacionária e que permitem uma elevada eficiência de separação ^[99]. Para aumentar o tempo de vida da coluna, é muitas vezes utilizada uma pré-coluna com a mesma fase estacionária que a coluna analítica, para diminuir a sua contaminação com impurezas e evitar o arrastamento da fase estacionária devido a pressões elevadas. Alguns equipamentos dispõem ainda um forno para controlar a temperatura da coluna ^[98].

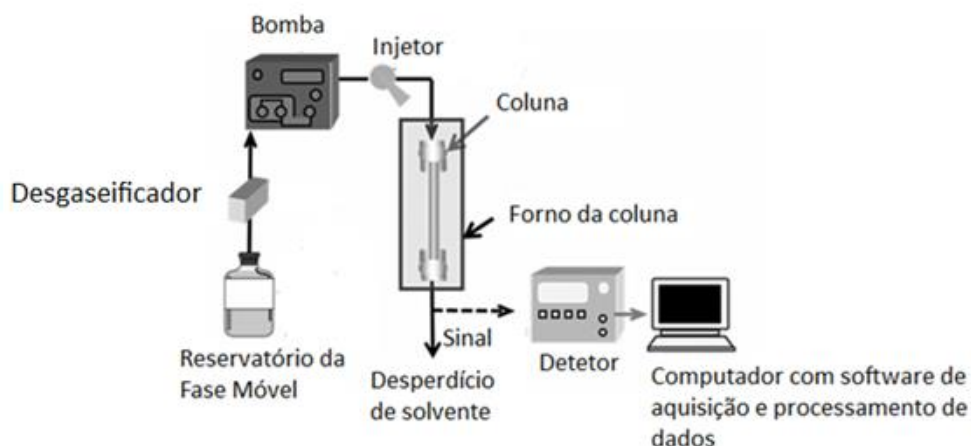


Figura 22: Sistema HPLC - adaptado de [97].

Em processos cromatográficos é muito importante que se escolha adequadamente a fase móvel e a fase estacionária para que a separação dos analitos seja o mais eficiente possível. A coluna C18 (coluna de Octadecilsilano) é constituída por sílica gel, que através dos seus grupos Si-OH liga-se quimicamente a um grupo funcional, conferindo-lhe grande estabilidade química. No caso desta coluna é o grupo, apolar, octadecil que se vai ligar à sílica (Figura 23) ^[100].

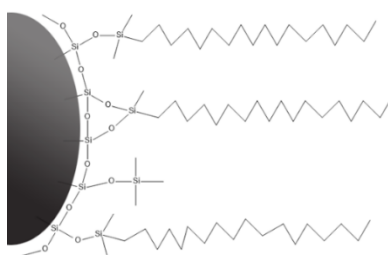


Figura 23:Fase Reversa C18 ^[101]

A coluna C18 é utilizada na cromatografia de fase reversa, ou seja, a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, assim os diferentes compostos vão eluir de acordo com a afinidade para com a fase estacionária. Quer com isto dizer-se que os compostos apolares, uma vez que têm maior afinidade com a fase estacionária, vão ficar retidos durante mais tempo nessa fase apresentando assim tempos de retenção maiores relativamente a compostos polares.

No sistema HPLC, a fase móvel colocada em reservatórios de vidro, tem de ser a mais pura possível e não pode conter resíduos sólidos, para isso são muitas vezes utilizados filtros metálicos que vão reter as partículas sólidas que possam existir. A fase móvel e a amostra devem também ser desgaseificadas antes da sua utilização, pois a formação de bolhas de gás no sistema cromatográfico pode causar variações de pressão no interior do sistema e/ou

perturbações mais ou menos graves no sinal do detetor. A desgaseificação pode fazer-se com recurso a várias técnicas sendo as mais eficientes, a purga de He, vácuo mais ultrassom, e através de um desgaseificador que remove o ar antes de entrar na coluna ^[102].

Neste processo a amostra é dissolvida na fase móvel (no caso de HPLC é líquida) e atravessa a fase estacionária imiscível fixa numa coluna sob alta pressão, com um fluxo controlado, o que permite que as análises sejam mais rápidas. Os diferentes componentes da mistura mover-se-ão com velocidade distintas dependendo de sua afinidade relativa para fase estacionária e também para o eluente. Se o composto é mais atraído pela fase estacionária do que pelo eluente, ele migrará lentamente, enquanto que se a sua afinidade for maior para o eluente, ele migrará mais rapidamente. A eluição pode ser feita mantendo sempre o mesmo eluente (eluição isocrática), ou variando a composição do eluente com o tempo (eluição por gradientes). Posteriormente o detetor regista o resultado na forma de um cromatograma (Figura 24), tipo de gráfico que mostra a resposta do detetor em função do tempo de retenção dos componentes da amostra ^[98].

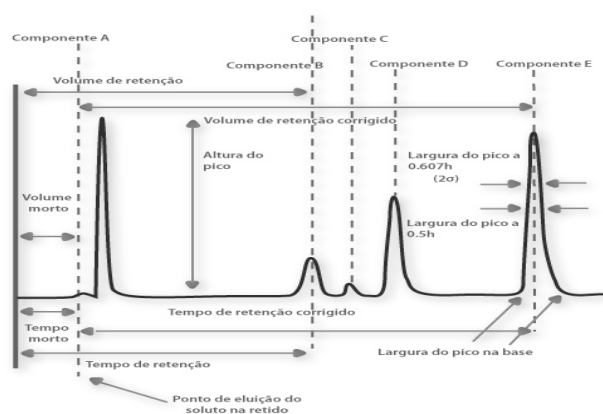


Figura 24: Representação de um cromatograma ^[103].

Num cromatograma podemos visualizar os tempos de retenção dos compostos da amostra (Figura 24) que são resultado das diferentes afinidades dos vários compostos para com a fase estacionária e para com a fase móvel, que faz com que eluam ao longo da coluna a determinadas velocidades. O tempo de retenção (t_R) vem expresso pela seguinte equação:

$$t_R = t'_R + t_M$$

Esta equação representa o tempo que o analito demora a percorrer a coluna desde a injeção da amostra até ao detetor. O tempo de retenção ajustado (t'_R) indica o tempo que o analito ficou retido na fase estacionária enquanto que o tempo morto (t_M) indica a velocidade média de eluição da fase móvel ^[104].

1.11 Técnica Hifenada

1.11.1 LC-MS

O sucesso de qualquer técnica analítica depende não somente da informação proporcionada, mas também da fiabilidade e da robustez da sua aplicação. A técnica hifenada LC-MS combina o poder de separação da cromatografia líquida, e o poder de análise da espetrometria de massa, tornando-se assim uma importante técnica analítica com elevada sensibilidade e seletividade.

1.12 Extração em Fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE) foi introduzida no início dos anos 70 e passou a ser comercializada em 1978, na forma de cartuchos descartáveis ^[105]. Desde então, tornou-se uma das técnicas de preparação de amostra mais utilizadas em laboratório.

O crescente interesse pela SPE deve-se sobretudo às vantagens que esta técnica apresenta, comparativamente a outros métodos de extração/purificação de amostras, entre elas a elevada seletividade, reprodutibilidade, rapidez de análise, aplicação de várias amostras em simultâneo, baixo consumo de solventes e facilidade de automatização ^[106]. Atualmente, a SPE tem sido empregue com sucesso em várias áreas como, alimentar, ambiental, farmacêutica, bioquímica e química orgânica ^{[107], [108]}.

A extração em fase sólida, também designada como um processo de extração líquido/sólido, pode ser descrita como uma aplicação da forma clássica de cromatografia líquida de adsorção descrita por Tswett. Esta técnica envolve a retenção seletiva de compostos num enchimento que se encontra dentro de pequenas colunas ^[106]. A SPE permite a remoção de interferentes da matriz, concentração e isolamento de analitos, presentes em matrizes complexas ^[105]. De acordo com o tipo de análise pretendida, pode-se separar o analito de outros compostos, pela retenção dos compostos interferentes ou do analito na fase estacionária ^[107]. Antes de proceder à análise é necessário ter em consideração alguns parâmetros, entre os quais, a escolha da fase estacionária, volume de amostra e de solvente necessário para ativação da fase estacionária e para a eluição dos analitos ^[105].

No presente trabalho, utilizou-se a SPE para concentrar os compostos fenólicos eliminando alguns dos compostos presentes na matriz, para isso foi utilizada uma fase estacionária C18 (cromatografia de fase reversa). A retenção dos analitos apolares, na fase estacionária C18 é

conseguida, principalmente, pela presença de interações hidrofóbicas, como interações π - π e de *van der Waals* ^[109]. Antes de colocar a amostra no cartucho é importante fazer o condicionamento do dispositivo de extração, assegurando a ativação da fase estacionária e a reprodutibilidade da interação com o analito. A escolha do solvente dependerá essencialmente do tipo de material a ser ativado (C8, C18, sílica, entre outros). Para a ativação de fases estacionárias apolares, o condicionamento é usualmente feito com metanol, ácido trifluoroacético, isopropanol entre outros (com aproximadamente dois a três volumes da coluna) ^[107].

1.13 FTIR

A espectroscopia de infravermelho é uma ferramenta valiosa para a análise de sistemas biológicos. As moléculas que compõem os sistemas biológicos complexos, como tecidos animais e vegetais, podem ser caracterizadas recorrendo à espectroscopia de infravermelho, além disso, cada vez mais esta técnica tem servido de ferramenta para a análise de proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ácidos nucleicos ^[110].

A espectroscopia de infravermelho (IV) mede as transições entre estados vibracionais das moléculas, que são induzidos através da irradiação da amostra com luz emitida na região do infravermelho. A maioria dos compostos químicos apresentam um espectro de infravermelho com picos bem definidos a determinadas frequências, que correspondem a frequências vibracionais de grupos funcionais específicos ou a arranjos das ligações, e por essa razão os espectros conseguem funcionar como impressões digitais para identificar um determinado composto. A frequência de vibração é geralmente adquirida como números de onda (cm^{-1}), a qual corresponde à frequência dividida pela velocidade da luz ^[111].

Os principais tipos de vibrações moleculares são denominados de vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*). As vibrações de estiramento envolvem uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre os dois átomos, podendo ser de dois tipos: estiramento simétrico e estiramento assimétrico. As vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança do ângulo entre duas ligações e podem ocorrer no plano ou fora do plano da molécula ^[112].

A espectroscopia FTIR, Fourier Transform InfraRed (Infravermelho por Transformada de Fourier), é o método de espectroscopia infravermelho mais utilizado. Apesar de ser um equipamento de elevado custo, este equipamento apresenta características que fazem do FTIR uma técnica usada com muita frequência por grupos de investigação, entre elas a elevada

sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez de análise e além disso é uma técnica não destrutiva [113], [114].

O componente mais importante da espectroscopia no FTIR é o interferômetro de Michelson. Quando um feixe de radiação monocromática incide no interferômetro, o mesmo atinge o divisor de feixe (*beam splitter*), no qual 50% da radiação é refletida e os outros 50% são transmitidos. A parte refletida atinge o espelho fixo e é refletida por este e volta para o divisor de feixes, atravessando-o, indo para o detetor. A outra parte que atravessou o divisor de feixe atinge um espelho móvel e é refletida por este, onde é refletida novamente dirigindo-se ao detetor. Quando os feixes se recombinaem, ao passarem pela segunda vez no divisor de feixe, criam uma onda modulada. A modulação do sinal resulta do atraso no percurso ótico de uma onda em relação à outra, que varia pelo movimento do espelho móvel, possibilitando assim, percorrer todos os comprimentos de onda em estudo com rapidez [110], [115]. O resultado final é um interferograma, ou seja, um gráfico de energia em função do deslocamento do espelho, formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e frequências que chegam ao interferômetro. Uma vez que o analista necessita de um espectro de frequência (um gráfico da intensidade em função frequência), a fim de fazer a análise da amostra, o sinal de interferograma medido não pode ser interpretado diretamente. É necessário um meio de "descodificar" as frequências individuais. Isto pode ser conseguido através de um computador no qual é aplicada a transformada de Fourier [116]. Os componentes básicos de um espectrómetro de FTIR estão esquematicamente representados na Figura 25.

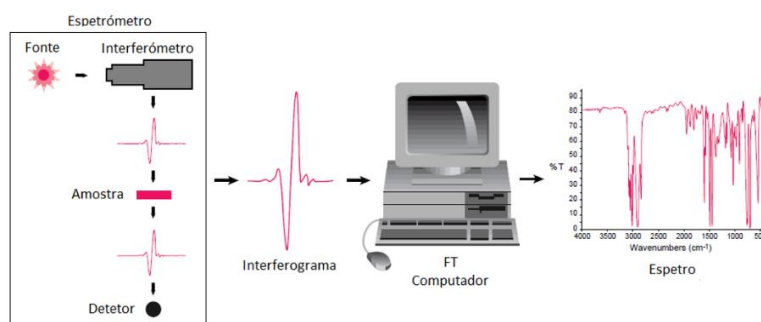


Figura 25: Componentes de um espectrómetro de FTIR - adaptado de [116].

1.14 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em gel é uma técnica vulgarmente utilizada para separar e identificar macromoléculas como DNA, RNA ou proteínas, pelo seu tamanho, forma ou ponto

isoeletrónico. A eletroforese é uma técnica na qual moléculas carregadas em solução migram pela matriz do gel sob ação de um campo elétrico ^[117].

A eletroforese por SDS-PAGE (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate*) permite separar as proteínas de acordo com o seu peso molecular (Figura 26) ^[118]. No SDS-PAGE as amostras são desnaturadas na presença de detergente (SDS), agente redutor, que quebra as ligações persulfureto das proteínas, separando a proteína nas suas sub-unidades e ao mesmo tempo, como surfatante aniónico, rodeia as cadeias proteicas, desnaturando-as e cobrindo-as com cargas negativas, permitindo assim que as proteínas sejam somente separadas em função do seu tamanho. Além disso, a desnaturação pelo SDS faz com que a proteína perca a sua estrutura terciária e, por conseguinte, velocidade de migração é proporcional ao tamanho e não a estrutura terciária ^[117].

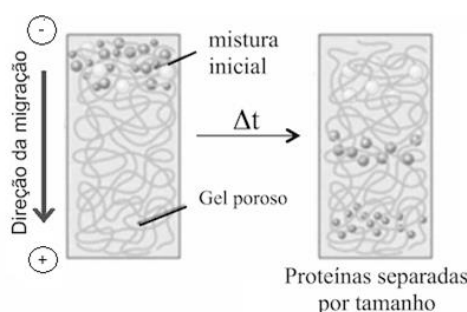
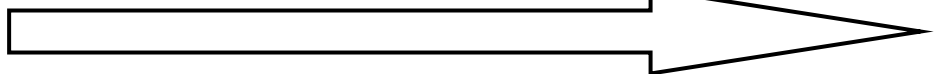


Figura 26: SDS-PAGE - adaptado de [118].

A electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é sem dúvida uma das técnicas mais amplamente utilizadas para caracterizar misturas complexas de proteínas. É um método conveniente, rápido e barato, uma vez que a quantidade de proteína necessária para o ensaio está na ordem dos microgramas ^[117]. O gel de poliacrilamida, entre outros reagentes, é constituído por uma mistura de dois polímeros, a acrilamida e a bis-acrilamida. Da mistura destes dois polímeros resulta uma matriz, gel poroso, com diâmetro dos poros controlado e definido através da concentração destes polímeros. Assim, quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros da matriz. Sendo assim a medida de porosidade do gel é geralmente medida em % de acrilamida presente na matriz. De acordo com o tamanho de cada proteína esta vai migrar de forma diferenciada ao longo do gel: proteínas de menor tamanho molecular migrarão mais rapidamente, enquanto que as de maior tamanho terão mais dificuldade em atravessar a “rede” do gel e, assim, movem-se mais lentamente ^{[118], [119]}.

Capítulo II – Objetivos

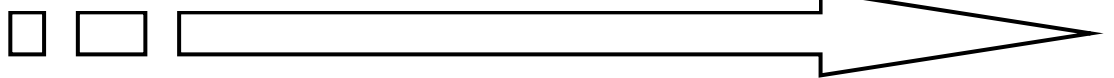


O trabalho experimental apresentado e desenvolvido nesta dissertação, teve como principal objetivo o aproveitamento das folhas de *Actinidia deliciosa*, resultantes do processo de poda da planta. No seguimento desse objetivo foram quantificados os teores em compostos bioativos, e avaliadas as atividades biológicas, de extratos aquosos das folhas de *Actinidia deliciosa*, recolhidas em diferentes estágios de desenvolvimento, desde o aparecimento das primeiras folhas até à altura da poda da planta. Foram ainda desenvolvidos métodos de purificação, do extrato de *Actinidia deliciosa*, de modo a obter frações ricas em compostos fenólicos.

Para o cumprimento destes objetivos foram desenvolvidos estudos parciais:

- Análise HPLC-DAD e LC-MS para cada um dos extratos aquosos de *Actinidia deliciosa*;
- Aplicação de métodos de purificação, entre os quais SPE, recolha por HPLC e precipitação de mucilagens. Com consequente determinação do melhor método por análise HPLC-DAD, quantificação de fenóis totais, taninos e por avaliação de atividade antioxidante pelo método do DPPH;
- Quantificação de fenóis totais, taninos, açúcares redutores, proteínas e mucilagens para cada um dos extratos em estudo;
- Análise de mucilagens por FTIR;
- Determinação das atividades anticolinesterase e antioxidantes, quer no sequestro de radicais livres, quer na inibição da peroxidação lipídica, para o para extrato com maior conteúdo em compostos fenólicos, e respetiva amostra purificada;
- Avaliação de atividades biológicas em linhas celulares Caco-2, para o extrato aquoso de *Actinidia deliciosa* e respetiva amostra purificada.

Capítulo III – Parte Experimental



3.1 Reagentes

Todos os compostos químicos utilizados foram de gradiente analítico. MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il] -2,5-difenil-tetrazólico), reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (sal de Rochelle), ácido gálico, rutina, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ácido clorídrico, tris(hidroximetil)aminometano, acetilcolinesterase (AChE), acetiltiocolina (AChI), 5,5'-ditiobis (2- ácido nitrobenzóico) (DTNB), acetona, glicina e peróxido de hidrogénio foram adquiridos da Sigma® (Barcelona, Espanha). Para os ensaios em linhas celulares, o meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), glutamina, Pen-Strep (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL), tripsina e FBS (*Fetum Bovine Serum*) foram adquiridos à Lonza® (Verviers, Bélgica). Hidróxido de sódio, brometo de potássio, dodecil sulfato de sódio, reagente Folin-Ciocalteu, cloreto de ferro (III), ferricianeto de potássio, ácido tânico, glucose, ácido trifluoroacético, quercitrina e 1-butanol foram adquiridos da Merck® (Darmstadt, Alemanha). Metanol, etanol e ácido fórmico foram obtidos da Carlo Erba® (Peypin, France). Água Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm, a 25 °C), foi retirada de um sistema de purificação de água Milli-Q Academic da Merck Millipore, USA. O Reagente de Bradford foi obtido a partir da Bio-Rad® (Hercules, California). Sulfato de ferro (II) heptahidratado e o ácido tricloroacético foram adquiridos da Riedel-de Haën®. Ácido tiobarbitúrico foi obtido a partir da Panreac AppliChem®. O Reagente de Griess, e o Nitroprussiato de sódio dihidratado foi adquirido da VWR®. Para a eletroforese unidimensional foi utilizado um gel de concentração 4-12% GE Healthcare Amersham™ECL™. O marcador de proteínas, tampão de amostra (5x SDS-PAGE) e a solução de coloração foram adquiridos da NZYTech®.

3.2 Linhas Celulares

A linha celular utilizada nos ensaios foi Caco-2, linha de células epiteliais do adenocarcinoma colo-rectal, (ATCC#HTB-37). A linha celular Caco-2 foi colocada a crescer e a desenvolver-se em meio RPMI, suplementado com 10 % de FBS, pen-strep e L-glutamina, numa estufa a 37 °C e numa atmosfera de 5 % de CO₂. A mudança do meio de cultura das Caco-2 foi feita a cada 48h.

3.3 Equipamento

As análises por HPLC-DAD foram realizadas num VWR-Hitachi Elite LaChrom® equipado com uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) (Merck) e *software* EZChrom Elite® (Agilent Technologies 2007), com injetor automático, um forno de coluna L-2300 e um detetor do tipo DAD (*diode array detector*) L-2455. Para a HPLC preparativa foi utilizado um coletor de frações Pharmacia Biotech® FRAC-100. As análises por LC-MS e LC-MS/MS foram efetuadas num equipamento HPLC Surveyor Plus Thermo Scientific acoplado a um espectrómetro de massa LCQ Duo Ion Trap Mass Spectrometer Thermo Scientific (San Jose, USA) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*. A coluna utilizada foi a LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) LiChroCART® 250-4 mm (Merck, Alemanha). As análises de FTIR foram realizadas num espectrofotómetro Nicolet™ FT-IR spectrometers da Thermo Electron Corporation com o detetor DTGS TEC, os espetros foram adquiridos numa gama espectral entre 400 – 4000 cm⁻¹ com uma resolução de 4 cm⁻¹.

As pesagens foram efetuadas numa balança analítica Sartorius CP225D e Sartorius BP110S, os ultra-sons foram feitos num SONOREX® Bandelin e Elma® Transsonic 460/H, foi também utilizada uma centrífuga Eppendorf® Minispin®, vortex da Heidolph® REAX 2000, placa de aquecimento com agitação Agimatic-N JP. Select®.

Para o SPE foi utilizado o sistema de vácuo da VARIAN® e cartuchos Teknokroma® Finisterre C18. Para a espectrofotometria usou-se um espectrofotómetro Shimadzu® UV-160A Spectrophotometer, no entanto para o ensaio dos taninos e do DPPH o espectrómetro utilizado um multi-canal leitor de microplacas TECAN® Sunrise. As medições de pH foram feitas num medidor de pH da WTW inoLab® e para incubação de amostras foi utilizado um banho de incubação da GFL® 1083.

Para o ensaio de fenóis foi utilizado um agitador orbital Stuart® SB2. As amostras foram liofilizadas num liofilizador Heto® PowerDry 3000. O evaporador rotativo utilizado foi o Butchi® Rotavapor R-200 com um sistema de vácuo Butchi® B-169. Para o ensaio de mucilagem foi utilizada uma centrífuga Eppendorf® 5804 R.

As condições de esterilidade/asepsia necessárias para o trabalho com as linhas celulares foram garantidas usando uma câmara de fluxo laminar Esco® Class II Biohazard Safety Cabinet, sendo a incubação de amostras realizada numa estufa Shel Lab CO₂ Series da Sheldon Mfg.Inc®. O microscópio ótico utilizado para a visualização das células foi um MOTIC® AE21.

A medição da resistência das membranas celulares foi efetuada recorrendo ao uso de um medidor Millicell® ERS-2 equipado com um elétrodo MERSSTX01. Para o ensaio eletroforético das proteínas das Caco-2 foi utilizado uma caixa de gel da GE Healthcare Amersham™ECL™. A fonte de alimentação foi adquirida da VWR®. Para obter um registo fotográfico do gel de eletroforese foi utilizado um processador de imagem ImageQuant LAS 500 de GE Healthcare®.

3.4 Plano de Amostragem

Foram analisados diferentes extratos de folhas da *Actinidia deliciosa*, pertencente à família dos *Actinidaceae*, recolhidas no período aparecimento das primeiras folhas (abril de 2014), no período de frutificação (setembro-novembro de 2015) e no período de poda da planta (dezembro de 2015), em Portugal na região da Beira Baixa (latitude 39° 46' 47,783'' N; Longitude 7° 48' 20,171'' O; altitude 244 m). As folhas foram lavadas e prontamente utilizadas para a preparação da decocção.

3.5 Preparação da Amostra

Para a preparação dos extratos, foram feitas decocções das diferentes folhas de *Actinidia deliciosa*. Para tal, pesou-se 10 g de folhas, previamente lavadas, e colocou-se em 100 mL de água desionizada, deixando-se ferver o preparado durante 10 minutos. Findado este tempo, arrefeceu-se ligeiramente o preparado, filtrando-se de seguida com papel de filtro Nº1 da Whatman. O extrato foi congelado para posterior liofilização. O rendimento da extração dos diferentes extratos ficou entre 101-123 mg de extrato/g de folha.

3.6 Condições de Análise por HPLC-DAD

Para a análise por HPLC foi utilizada uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) e uma fase móvel constituída por um sistema binário de ácido trifluoracético (0,05 % em água Milli-Q) (A) e metanol (B) a um fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 25 µL de amostra (1 mg/mL) com eluição em modo gradiente (composição do eluente varia com o tempo de análise) (Tabela 1). A deteção foi feita entre os 200 e os 500 nm.

Tabela 1: Programa do HPLC.

Tempo (minutos)	%A	%B
0	80	20
20	20	80
25	20	80
28	80	20
30	80	20

3.7 Condições de Análise LC-MSⁿ

Tendo como base o artigo “*Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion*”^[36]. Para a análise por LC-MSⁿ foi utilizada uma LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 250-4 mm (Merck, Alemanha) e uma fase móvel constituída por um sistema binário de ácido fórmico (0,1 %) (A) e metanol (B) a um fluxo de 1 mL/min (Tabela 2). O volume de injeção foi de 25 µL de amostra previamente preparada de 10 mg/mL e a eluição foi em modo gradiente, constituída por:

Tabela 2: Programa do LC.

Tempo (minutos)	%A	%B
0	80	20
20	20	80
25	20	80
30	80	20

Os espectros de massa foram adquiridos em modo negativo na gama de m/z de 50-2000 e os parâmetros do espectrómetro de massa foram ajustados com vista a otimizar a relação sinal/ruído (S/N) para os iões de interesse. Os fluxos do nebulizador e do gás auxiliar (azoto) foram de 40 e 20 (unidades arbitrárias) e a temperatura capilar foi estabelecida nos 250 °C, e com energias de colisão de 40 e 45 eV.

3.8 Purificação de Compostos Fenólicos

Ao extrato liofilizado das folhas de *Actinidia deliciosa* de abril de 2014, foram aplicados métodos de purificação de compostos fenólicos, usando cromatografia de fase reversa

(extração em fase sólida (SPE) e recolha de frações por HPLC), e precipitação de mucilagens, com o intuito de tentar obter um extrato mais concentrado em compostos fenólicos, retirando alguns dos compostos presentes na matriz, que levam a que a concentração em compostos fenólicos por miligramas de extrato seja relativamente baixa ^{[120], [121]}.

3.8.1 Extração em Fase Sólida (SPE)

Este procedimento foi baseado no artigo “*Simultaneous Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in Rice Using Solid-Phase Extraction and RP-HPLC with Photodiode Array Detection*” ^[122].

O cartucho foi condicionado com 1 mL de metanol e 1 mL de HCl 0,05 M. De seguida, uma solução de 5 mg/mL de extrato (abril de 2014) em HCl 0,05 M foi colocada num cartucho C18 e eluída, depois os analitos que ficaram adsorvidos no cartucho foram eluídos com uma solução metanol/1 % ácido acético em água (70:30). Deste processo resultaram duas frações: fração 1, coletada durante a permeação da amostra e a fração 2 coletada durante a eluição do analito (Figura 27). As duas frações foram secas sob azoto e reconstituídas com água e metanol (33/67). Posteriormente cada uma das frações foi analisada por HPLC-DAD. Foi quantificado o conteúdo em fenóis totais e taninos, e foi avaliada a atividade antioxidante.

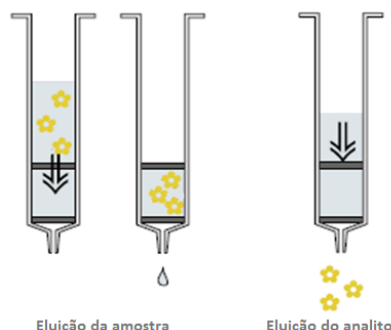


Figura 27: Esquema da SPE desenvolvido neste trabalho - adaptado de [107].

3.8.2 Recolha de Frações do HPLC

Inicialmente foi preparada uma solução de 10 mg/mL do extrato de *Actinidia deliciosa* de abril. As condições do HPLC utilizadas foram as descritas no ponto 3.6. Foram efetuadas várias injeções e recolhidas três frações perfazendo 9 mg de amostra total injetada. Para cada injeção no HPLC foram recolhidas três frações, dependendo dos tempos de retenção, fração 1: 3 minutos iniciais da injeção; fração 2: a partir dos 3 minutos até aos 17 minutos, e por último a fração 3: dos 17 minutos aos 30 minutos. As frações recolhidas foram analisadas por HPLC-

DAD. Foi quantificado o conteúdo em fenóis totais e taninos, e foi avaliada a atividade antioxidante.

3.8.3 Precipitação de Mucilagens

A precipitação de mucilagens do extrato de *Actinidia deliciosa* teve como base o artigo “*Mucilage and Polysaccharides in the Halophyte Plant Species Kosteletzkya Virginica: Localization and Composition in Relation to Salt Stress*”^[52], tendo sofrido algumas modificações.

Para a determinação de mucilagens inicialmente pesou-se 10 mg de extrato, ao qual foi adicionado 1 mL de água para dissolução do extrato. De seguida adicionou-se 4 mL de etanol 96 %. A solução foi colocada no frio durante 15 horas e foi centrifugada durante 30 minutos, a 4 °C com 3500 g. Separou-se o precipitado do sobrenadante. O precipitado foi seco com azoto e reextradito mais três vezes, utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram misturados, e devido à presença do etanol, o sobrenadante (total) foi seco e lavado três vezes com água *Milli-Q*. Depois do precipitado e sobrenadantes estarem devidamente secos, reconstituiu-se com água *Milli-Q* para concentrações finais de 1 mg/mL. As amostras foram analisadas por HPLC e foram igualmente quantificados os fenóis totais, taninos e atividade antioxidante.

3.9 Quantificação de Compostos Bioativos

Para a caracterização das diferentes decocções de *Actinidia deliciosa* foram empregues diferentes metodologias. A análise qualitativa e quantitativa dos diferentes extratos foi feita a partir de técnicas analíticas de HPLC-DAD e LC-MSⁿ, e pela quantificação de fenóis totais, taninos, açúcares, mucilagens e proteínas.

3.9.1 Determinação de Fenóis Totais

A metodologia adotada para fazer a quantificação de compostos fenólicos, baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos para sofrer oxidação, e quelar metais na absorção na zona do UV-Vis. Para este ensaio utiliza-se o reagente de Folin-Ciocalteu, que permite quantificar os grupos hidroxilo presentes na amostra. Este ensaio envolve uma reação de oxidação-redução, em meio alcalino (Na_2CO_3), na qual o ião fenolato é oxidado, e o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico presente no reagente de Folin- Ciocalteu é reduzido a mistura de óxidos de tungsténio e de molibdénio, de cor azul (Figura 28). A coloração desenvolvida

(absorção máxima a 760 nm) é proporcional ao teor de compostos fenólicos presentes amostra ^{[123], [124]}.

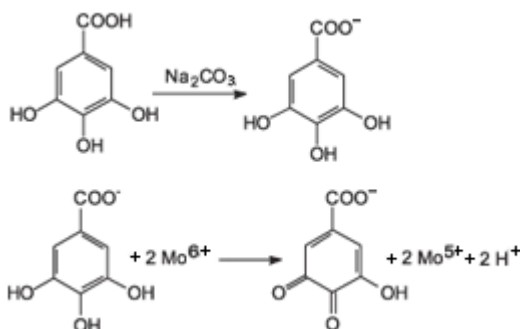


Figura 28: Reação do ácido gálico, composto fenólico, com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu ^[124].

Procedimento

O doseamento de fenóis totais foi feito de acordo com o método de Oktay et al. (2003) ^[125], tendo sido sujeito a algumas alterações. Para a realização da curva de calibração foi utilizado o reagente padrão de ácido gálico, cuja estrutura se encontra representada na Figura 4. Depois de feita a reta de calibração fez-se a análise das diferentes amostras. Para isso, adicionou-se, num *eppendorf*, 1350 μL de água *Milli-Q*, 30 μL de extrato (1 mg/mL) e 30 μL reagente de Folin–Ciocalteu. Esperou-se 3 minutos e adicionou-se 90 μL de uma solução carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 2 %. As soluções foram colocadas em agitação contínua durante 2 horas. A absorvância (A) foi medida a 760 nm, em triplicado, e as retas de calibração foram feitas para os diferentes solventes das amostras. A reta de calibração com o solvente de água/metanol foi desenvolvida para a análise da fração do SPE, e para as restantes amostras foi utilizada a reta com água como solvente.

Reta de Calibração para água/metanol como solvente:

$$A_{760} = 0,0269 [\text{ácido gálico}]_{\mu\text{g/mL}} + 0,0112, (R^2 = 0,991)$$

Reta de Calibração para água como solvente:

$$A_{760} = 0,0351 [\text{ácido gálico}]_{\mu\text{g/mL}} + 0,0004, (R^2 = 0,9995)$$

O resultado final é expresso em equivalentes de ácido gálico por mg de amostra seca. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

3.9.2 Determinação de Taninos

A metodologia adotada para fazer a quantificação dos taninos, baseia-se na capacidade destes compostos para sofrer oxidação, e consequentemente reduzir o complexo Fe(III)/ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$, à forma ferrosa, Fe (II), em meio ácido (HCl), de modo a manter a solubilidade do ferro. Os taninos são compostos facilmente oxidáveis por sais metálicos, como cloreto de ferro, resultando no escurecimento das soluções de cor azul.

Procedimento

O doseamento de fenóis totais foi feito de acordo com o método de Dhandapani and Sabna (2008) ^[126], tendo sido sujeito a algumas alterações. Para a realização da curva de calibração foi utilizado o reagente padrão de ácido tânico, cuja estrutura se encontra representada na Figura 10. Depois de feita a reta de calibração fez-se a análise das diferentes amostras. Para isso, adicionou-se, num *ependorf* 300 μL de água *Milli-Q*, 100 μL de extrato (1 mg/mL), 300 μL de uma solução de cloreto de ferro (FeCl_3) de 0,1 M (preparado em HCl 0,1 M) e por fim 300 μL de uma solução de ferricianeto de potássio $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ de 0,008M. De seguida foi lida a absorvância a 605 nm em microplacas, em triplicado, e as retas de calibração foram feitas para os diferentes solventes das amostras. A reta de calibração com o solvente de água/metanol foi desenvolvida para a análise da fração do SPE, e para as restantes amostras foi utilizada a reta com água como solvente.

Reta de Calibração para água/metanol como solvente:

$$A_{605} = 0,1958 [\text{ácido tânico}]_{\mu\text{g/mL}} + 0,0046, (R^2 = 0,9909)$$

Reta de Calibração para água como solvente:

$$A_{605} = 0,1943 [\text{ácido tânico}]_{\mu\text{g/mL}} - 0,0043, (R^2 = 0,99)$$

O resultado final é expresso em equivalentes de ácido tânico por mg de amostra seca. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições. Tendo em conta que este é apenas um ensaio de deteção da sua presença, não existe distinção entre taninos hidrolisáveis e condensados. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

3.9.3 Determinação de Açúcares Redutores

Para a determinação de açúcares redutores foi utilizado o método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). O método colorimétrico, DNS, baseia-se essencialmente na reação entre o açúcar redutor e o DNS (cor amarela) sob condições alcalinas. O DNS na presença de açúcares redutores é reduzido, e o açúcar oxidado, formando-se um composto vermelho-alaranjado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) com o máximo de absorção aos 540 nm (Figura 29) ^[127].

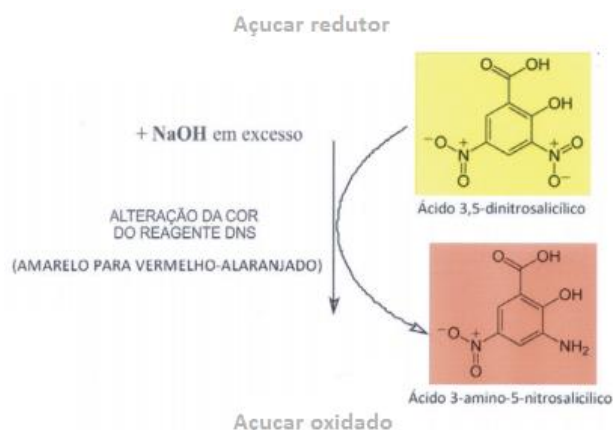


Figura 29: Esquema representativo da reação envolvida no método DNS - adaptado de [127].

Procedimento

A determinação de açúcares redutores foi feita de acordo com o ensaio do DNS ^[128]. Para realizar este ensaio foi necessário preparar o reagente de DNS. Para a preparação do reagente, pesou-se 0,5 g de DNS e 0,8 g de NaOH, juntou-se os dois reagentes e adicionou-se 25 mL de água *Milli-Q*. A solução foi então aquecida, sob agitação. Depois de dissolvido adicionou-se 15 g de tartarato duplo de sódio e potássio (C₄H₄KNaO₆·4H₂O) à solução, mas agora a dissolução foi feita só com agitação. No entanto para total dissolução teve de se aquecer um pouco a solução. Depois aferiu-se o volume para 50 mL com água *Milli-Q*. A solução deve de ser mantida ao abrigo da luz, guardando-a num frasco escuro, à temperatura ambiente.

Para a realização da curva de calibração foi utilizado o reagente padrão de glucose, cuja estrutura se encontra representada na Figura 30.

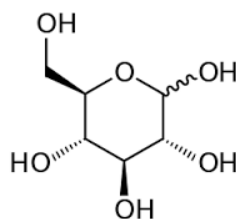


Figura 30: D-glucose

Para a quantificação de açúcares redutores na amostra, num *falcon* pesou-se 5 mg de cada extrato e adicionou-se 1 mL de uma solução de H_2SO_4 1,5 M. O *falcon* foi aquecido num banho de água em ebulição durante 20 minutos, agitando-se de vez em quando. O *falcon* foi então arrefecido e adicionou-se cuidadosamente 1,2 mL de uma solução NaOH a 10 %. Aqueceu-se ligeiramente o *falcon* e filtrou-se enquanto quente para um balão de 5 mL. O *falcon* foi lavado com água destilada quente e adicionou-se ao filtro, de modo a que o material hidrolisado seja todo transferido. Perfez-se o volume do balão para 5 mL e agitou-se bem.

Depois retirou-se 2 mL de hidrolisado, e adicionou-se retirou-se 1 mL de DNS e 1 mL de água *Milli-Q*. A solução foi aquecida num banho de água a ferver durante 5 minutos, sendo posteriormente arrefecida e o conteúdo de do *falcon* foi transferido para um balão de 25 mL e perfez-se o volume com água *Milli-Q*. De seguida foi lida a absorvância (A) a 540 nm. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

Reta de Calibração:

$$A_{540} = 0,0026 [\text{açúcar redutor}]_{\mu\text{g/mL}} + 0,0098, (R^2 = 0,967)$$

3.9.4 Determinação de Proteínas

A quantificação de proteínas foi feita de acordo com o método de Bradford ^[129]. O método de Bradford é um ensaio colorimétrico utilizado para a quantificação de proteínas em solução. Neste ensaio dá-se a formação de um complexo entre o corante de Coomassie (reagente de Bradford) e as proteínas em solução. O reagente é preparado sob condições acídicas, resultando na forma catiónica que tem um máximo de absorção a 465 nm ^[130]. Na forma catiónica o reagente apresenta uma coloração vermelha. Quando em solução existe conteúdo proteico o reagente de Bradford liga-se às proteínas, através de interações π - π , interações electrostáticas, e interações hidrofóbicas, resultando na forma aniónica estável de cor azul (Figura 31) ^[131].

O complexo proteína-corante causa uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 nm para 595 nm ^[132]. Assim a quantidade de corante que se encontra ligado a proteínas pode ser quantificada pela medição de absorvância da solução a 595 nm ^{[129], [130]}.

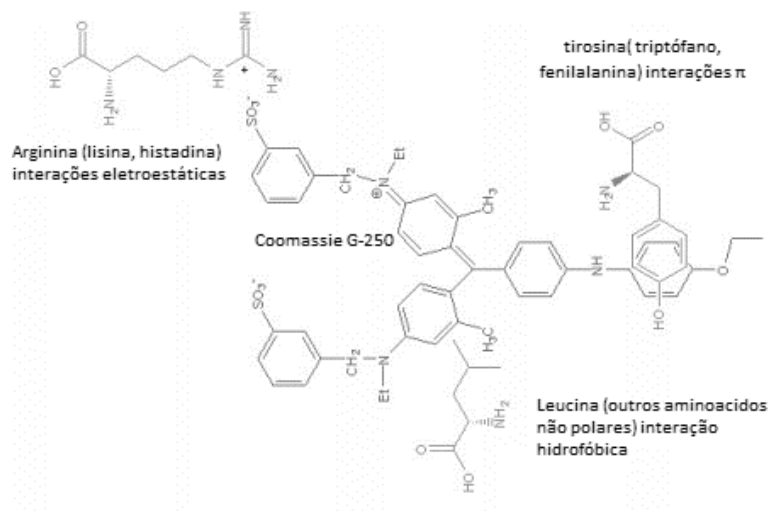


Figura 31: Exemplos de interações do Coomassie com os resíduos de aminoácidos - adaptado de [133].

Procedimento

Para a realização da curva de calibração foi utilizado o reagente padrão de BSA. Depois de feita a reta de calibração fez-se a análise das diferentes amostras. Para isso, a 200 μ L de amostra (1 mg/mL), foram adicionados 200 μ L de reagente Bradford e 600 μ L de água MilliQ. As soluções foram a *vortex*, de modo a homogeneizar bem as soluções, esperou-se 5 minutos e leu-se a absorvância a 595 nm. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

Reta de Calibração:

$$A_{595} = 0,052 [\text{proteína}]_{\mu\text{g/mL}} + 0,1009 (R^2 = 0,91)$$

3.9.5 Quantificação e Análise por FTIR das Mucilagens

Após a obtenção do precipitado a partir do processo de precipitação com etanol (de acordo com o ponto 3.8.3), o precipitado foi liofilizado e pesado.

Os grupos funcionais presentes na mucilagem (adquiridas de acordo como ponto 3.8.3) foram analisados num espectrofotômetro *Nicolet™ FT-IR spectrometers* da *Thermo Electron Corporation* com o detetor DTGS TEC, os espectros foram adquiridos numa gama espectral entre 400 – 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} e 256 números de *scans*. O espectro do

background deve ser traçado exatamente nas mesmas condições em que é traçado o espectro da amostra, mas sem amostra. A amostra seca (1 mg) foi misturada com KBr e prensado em pastilhas sob pressão mecânica (6 toneladas).

3.9.6 Quantificação de Rutina e Quercitrina

A quantificação de rutina e quercitrina foi feita por HPLC-DAD (de acordo com o ponto 3.6), com a injeção de soluções padrão. Foram testadas, concentrações entre 0,002 mg/mL e 0,05 mg/mL. A partir dos cromatogramas, fez-se a representação gráfica das intensidades (I) dos picos da rutina e quercitrina, em função da concentração. O conteúdo em rutina, e quercitrina em mg/mL, foi calculado através da equação da reta:

Reta de calibração:

$$I_{(tr=13,3)} = 6 \times 10^6 \times [\text{rutina}] \times + 9615,2, (R^2 = 0,9959)$$

Reta de calibração:

$$I_{(tr=14,6)} = 1 \times 10^7 \times [\text{quercitrina}] + 12746, (R^2=0,9817)$$

O resultado final é expresso em concentração de rutina/quercitrina por mg de amostra seca. Para cada amostra analisada foram feitas duas medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

3.10 Atividades Biológicas

Para as diferentes amostras foi avaliada a sua atividade biológica, no que diz respeito à sua capacidade antioxidante e à capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

3.10.1 Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante das diferentes amostras foi desenvolvida de acordo com três métodos diferentes, o método do DPPH, inibição da peroxidação lipídica e atividade captadora de radicais de óxido nítrico.

3.10.1.1 Ensaio do DPPH

O ensaio do DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), é um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante de extratos de plantas, é um método colorimétrico, que

mede a capacidade antioxidante de uma substância em captar o radical DPPH. Isto acontece quando o eletrão desemparelhado do radical DPPH é emparelhado com um átomo de hidrogénio do composto antioxidante reduzindo-o a hidrazina, consequentemente a solução de DPPH inicialmente de coloração violeta (radical DPPH) muda para amarelo pálido (hidrazina) (Figura 32) ^[134].

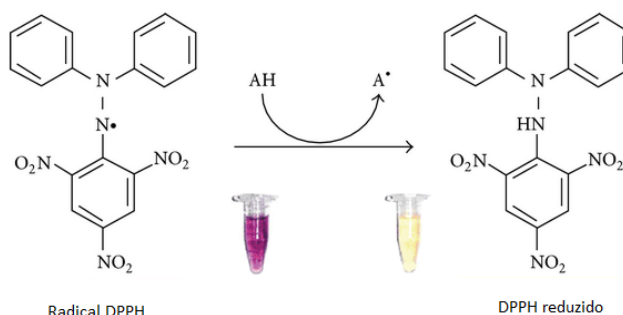


Figura 32: Representação esquemática da redução do radical livre DPPH[•] na presença de uma substância com propriedades antioxidantes - adaptado [135].

Procedimento

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada de acordo com o método do DPPH ^[36]. A 1 mL de DPPH (0,002 % em metanol) adicionou-se 10 µL de amostra, a diferentes concentrações. De seguida, as soluções foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente (23 °C), e numa microplaca a leitura da absorvância foi lida a 517 nm, contra um branco de metanol. O ensaio do controlo foi efetuado substituindo a amostra, pelo solvente da amostra. Os cálculos foram efetuados da seguinte maneira:

$$\text{Atividade antioxidante} = 100 \times (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{DPPH}}$$

Em que A_{DPPH} é a absorção da solução de controlo de DPPH contra o branco, A_{amostra} representa a absorvância do extrato contra o branco. A concentração de extrato que produz 50 % da atividade antioxidante (EC_{50}) foi obtida representando graficamente a atividade antioxidante em função da concentração de extrato. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

3.10.1.2 Inibição da Peroxidação Lipídica – Método dos TBARS

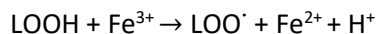
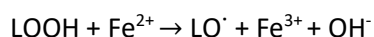
A peroxidação lipídica por radicais livres ocorre em três fases: iniciação, propagação e finalização. Na iniciação um radical livre (como o $\cdot\text{OH}$) entra em contato com as membranas

celulares, e consequentemente, dá-se a captação de um hidrogénio de um lípido. O radical lipídico (L[•]) recém-formado sofre um rearranjo, adquirindo a estrutura de dieno conjugado ^[136], ^[137]. No ensaio desenvolvido neste trabalho, o sistema oxidativo foi conseguido pela reação de Fenton (Fe²⁺/ H₂O₂) na qual são produzidos radicais [•]OH, que apresentam alto potencial redox, atacando indiscriminadamente todas as espécies presentes no meio reacional ^[138].



Para que a reação de Fenton ocorra é necessário excesso de peróxido de hidrogénio, uma vez que este pode ser decomposto através da ação de proteínas com atividade peroxidase, tais como a catalase e a mioglobina, antes de desempenhar a sua função na reação de Fenton ^[139].

Na fase da propagação, o radical lipídico reage com a molécula de oxigénio, conduzindo à formação do radical peroxilo (LOO[•]). Este radical é capaz de reagir com outro ácido gordo polinsaturado, pela captação do hidrogénio, formando o hidroperóxido (LOOH), iniciando uma nova cadeia de oxidação pela formação de outro radical lipídico (L[•]). Os hidroperóxidos lipídicos são instáveis na presença de metais de transição, tais como ferro ou cobre, e formam radicais alcóxido (LO[•]) e peroxilo (LOO[•]) ^[140]:



Tanto o radical peroxilo como o radical alcóxido são capazes de retirar um hidrogénio a um novo ácido gordo polinsaturado, contribuindo para a propagação da peroxidação lipídica. A decomposição dos hidroperóxidos lipídicos é importante porque, além de gerar radicais que propagam a peroxidação lipídica, gera produtos não radicalares (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros), que danificam as células. A finalização, ocorre quando há uma condensação de radicais, ou pela ação de compostos antioxidantes que doam um hidrogénio ao radical peroxilo ou alcóxido ^[136], ^[137], ^[140].

Procedimento

A formação de peróxidos lipídicos foi avaliada de acordo com o método de Tokur and Kormaz (2007) ^[141]. Uma grama de tecido muscular de salmão foi homogeneizada em 10 mL de tampão fosfato de sódio, pH 7,4, (PBS 1x). Ao homogeneizado adicionou-se 1 mL de extrato, testando diferentes concentrações, e depois de agitação vigorosa, adicionou-se 1 mL de sulfato ferroso (15 mM) e 2 mL de peróxido de hidrogénio (1mM).

Para o controlo com oxidação total, em vez de extrato, adicionou-se 1 mL de água *Milli-Q*, 10 mL da solução de salmão e 1 mL sulfato ferroso e 2 mL peróxido de hidrogénio. Para o controlo sem oxidação, foram adicionados 10 mL da solução de salmão, 1 mL de água *Milli-Q*, e em vez de se adicionar o sulfato ferroso e peróxido de hidrogénio, os 3 mL são somente de PBS 1x.

As misturas foram incubadas durante uma hora num banho a 37 °C. Após uma hora de incubação, da mistura reacional retirou-se 0,5 mL para um *falcon* e adicionou-se 0,25 mL de 1 % de ácido tiobarbitúrico (m / v) em NaOH 0,05 M e 0,25 mL de 2,8 % de ácido tricloroacético (m / v). As amostras foram de seguida colocadas num banho de água a ferver durante 10 minutos. Depois da incubação arrefeceu-se as amostras em gelo e extraiu-se com 2 mL de n-butanol. Quando a fase do n-butanol ficou translúcida, a intensidade da cor foi lida a 535 nm. A percentagem de inibição foi calculada utilizando a fórmula mencionada no método do DPPH. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

3.10.1.3 Atividade Sequestradora de Radicais de Óxido Nítrico

O óxido nítrico, radical livre, pode funcionar na célula como uma molécula de sinalização, possuindo vários efeitos biológicos, entre os quais, a neurotransmissão, vasodilatação e várias funções cardiovasculares. Uma vez dentro da célula, o NO pode reagir com oxigénio molecular, ou outras espécies de oxigénio radicais (ROS) formado, à formação de espécies de azoto reactivo (RNS), como o peroxinitrito ^[142].

A atividade captadora de radicais de óxido nítrico foi feita de acordo com o método de Sakat *et al.* (2010) ^[143], tendo sofrido algumas modificações. Neste ensaio o nitroprussiato de sódio decompõe-se em solução aquosa (pH = 7,2), dando origem a óxido nítrico. Em condições aeróbicas, o óxido nítrico reage com o oxigénio conduzindo à formação de produtos estáveis (nitrato e nitrito). Os compostos que apresentem atividade sequestradora de radicais de óxido nítrico competem com o oxigénio levando ao decréscimo na produção de radicais nitrito ^[143].

Procedimento

A 0,5 mL de amostra, a diferentes concentrações, foi adicionada 0,9 mL de nitroprussiato de sódio (20 mM) dissolvido previamente em PBS 1x. As diferentes misturas foram incubadas a 23 °C durante 2,5 horas. Posteriormente, a quantidade de nitrito formado, proporcional à quantidade de óxido nítrico livre que reagiu com o oxigénio, foi determinada

espectrofotometricamente a 450 nm após a adição de 0,9 mL de reagente de Griess. A absorvância do cromóforo que se formou durante a diazotação do nitrito com sulfanilamida e acoplamento subsequente com dicloridrato de naftiletlenodiamina foi imediatamente lida a 450 nm. A percentagem de inibição foi calculada utilizando a fórmula mencionada no método do DPPH. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

3.10.2 Inibição da Acetilcolinesterase

Neste ensaio, a acetiltiocolina foi usada como substrato para a AChE, originando acetato e tiocolina. Da reação de tiocolina com o (DTNB) resulta 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e o ião 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) que tem um pico de absorvância a 405 nm. Estas reações estão apresentadas na Figura 33.

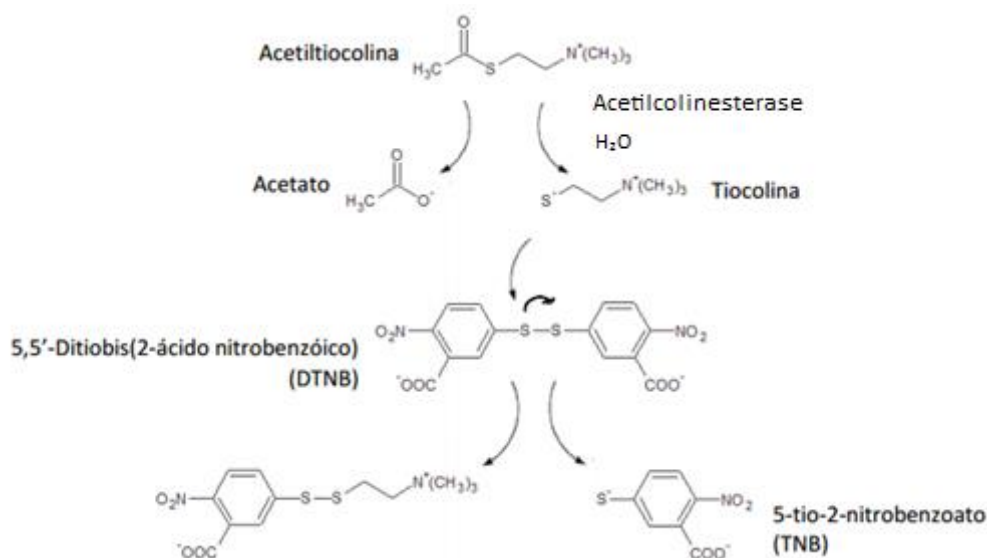


Figura 33: Reação para o ensaio de Ellman para determinar a atividade da enzima acetilcolinesterase - adaptado [38].

Procedimento

A atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) foi medida como descrito no método de Falé *et al.* (2013) [36]. Para testar a atividade de inibição da enzima pelo extrato adicionou-se 350/325 μL (na *cuvette* de trás e frente, respetivamente) de tampão Tris 50 mM, pH = 8, 100 μL de amostra (com diferentes concentrações, de modo a calcular o valor de IC_{50}) e 25 μL de uma solução de acetilcolinesterase (0,25 U/mL) na *cuvette* da frente. Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente (25 °C). Após os 15 minutos, adicionou-se a cada *cuvette* 75

μL de substrato (solução de acetilcolina) e 475 μL de DTNB. A solução de DTNB (30 mg de DTNB ressuspensos em 25 mL de tampão tris com sais) deve ser feita antes de cada ensaio. A absorvância foi lida a 405 nm durante 4 minutos em intervalos de 10 segundos. Foi calculada a velocidade da reação. Efetuou-se também um controlo desta reação, em que a amostra foi substituída por água *Milli-Q*, considerando-se este ensaio como o ensaio em que se regista atividade máxima, ou seja, 100 %. A atividade inicial da enzima deve ficar entre 0,10-0,11 UA/mL. Os cálculos foram efetuados da seguinte maneira:

$$I (\%) = 100 - (V_{\text{amostra}} / V_{\text{controlo}}) \times 100$$

Onde I é a percentagem de inibição da acetilcolinesterase, V_{amostra} é a velocidade inicial reação contendo o extrato e V_{controlo} é a velocidade inicial da reação com a enzima. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

3.11 Ensaio em Linhas Celulares Caco-2

Para os ensaios em linhas celulares Caco-2, foram utilizadas duas amostras: o extrato inicial (pó liofilizado depois da decocção-ponto 3.5) e a amostra purificada (de acordo com o ponto 3.8.3). Os ensaios em Caco-2 permitiram avaliar a citotoxicidade das amostras e a permeação dos compostos fenólicos nas células do intestino. Foi também desenvolvida uma análise eletroforética para avaliar até que ponto a presença de mucilagens no extrato influenciaria a expressão proteica no citosol das células, após o processo de permeação.

3.11.1 Determinação da Citotoxicidade nas Caco-2

Ainda nos dias de hoje o ensaio de avaliação da citotoxicidade utilizando o ensaio da redução do MTT continua a ser amplamente adotado por investigadores, de acordo os milhares de artigos publicados ^[144]. O ensaio de redução do MTT, é um ensaio colorimétrico que mede a redução do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol), um composto amarelo escuro solúvel em água, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase mitocondrial de células viáveis, originando como produto o formazan, um composto roxo solúvel em solventes orgânicos (Figura 34). O formazan acumula-se no interior das células, nas proximidades da superfície da célula e no meio de cultura como um precipitado insolúvel. Para a posterior leitura da absorvância é necessário solubilizar o formazan, o qual pode ser conseguido utilizando por exemplo metanol ou DMSO. A enzima succinato desidrogenase atua

como uma doadora de elétrons na redução do MTT e é somente ativa em células com metabolismo ativo ^{[144], [145], [146]}.

Após a adição de uma solução de MTT às células deve sempre seguir-se a incubação das células por um período de 1 a 4 horas. Uma vez que esta conversão ocorre apenas em células vivas, a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis na cultura ^[144].

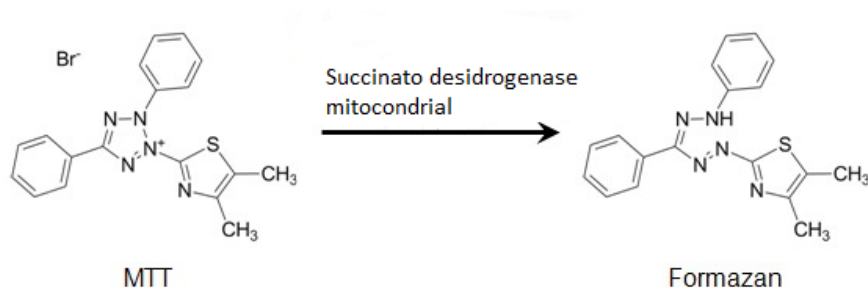


Figura 34: Reação de redução de MTT a formazan pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial - adaptado de ^[144].

Procedimento

O ensaio da citotoxicidade foi feito para o extrato de *Actinidia deliciosa* de outubro de 2015 (de acordo com o ponto 3.5) e para a solução de sobrenadante resultante da precipitação das mucilagens (ponto 3.8.3).

Inicialmente a linha celular Caco-2 foi colocada a crescer e a desenvolver em frascos de cultura T75, em meio RPMI, numa estufa, a 37 °C contendo 5 % de CO₂. Após se verificar a confluência celular adequada, o meio foi descartado e as células lavadas com 3 mL de PBS (1:9 (v/v)). Para a tripsinização das células adicionou-se 2 mL de tripsina, enzima proteolítica, que é responsável pela quebra das ligações peptídicas nas proteínas que mantêm a adesão das células ao frasco de cultura e incubou-se durante 5 minutos na estufa, a 37°C numa atmosfera de 5 % de CO₂.

Depois de findados os 5 minutos, foi necessária alguma agitação uma vez que alguns dos *stocks* eram difíceis de tripsinizar. Quando macroscopicamente parecia que as células estavam soltas observou-se no microscópio, e quando finalmente se constatou que as células tinham tripsinizado corretamente procedeu-se então à contagem de células viáveis num hemacitômetro, recorrendo à solução de azul tripano. O azul tripano ao atravessar a membrana das células inviáveis ficam coradas de cor azul permitindo distinguir estas células das que são viáveis e que são as que serão consideradas para a contagem. As células viáveis,

nas quais a membrana permanece intata, não incorporam o azul de tripano. Às células retiradas do frasco adicionou-se meio RPMI de forma a obter uma concentração final de 5×10^4 células/mL.

Depois de preparado o *stock* de células na concentração pretendida (5×10^4 células/mL) uma suspensão de células (100 μ L) foram colocadas a crescer e a diferenciarem-se em microplacas de 96 poços com uma concentração de 5×10^3 células/poço em meio RPMI, até atingirem a aderência e confluência pretendida (cerca de 72 h), na estufa, a 37 °C numa atmosfera de 5 % de CO₂. Depois de atingida a aderência e confluência desejada, o meio foi removido, por inversão da microplaca, e adicionou-se a cada poço 100 μ L de solução de extrato e sobrenadante de 1 mg/mL, dissolvidas anteriormente em meio RPMI. Sendo assim cada poço esteve exposto a 0,1 mg/mL de sobrenadante e extrato.

Ao fim de 24 h de incubação na estufa, as soluções foram substituídas por 100 μ L em cada poço por uma solução de MTT (1 mg/mL de meio de RPMI) e voltou a incubar-se, nas mesmas condições, durante 4 h. O ensaio do MTT foi feito de acordo com Mosmann (1983) ^[147].

Retirou-se o MTT, tendo o cuidado de não deixar vir células para a micropipeta e adicionou-se em cada poço 100 μ L de metanol. Aguardou-se 1 h e leu-se absorvância 595 nm num leitor de microplacas. O ensaio de controlo foi preparado com as células crescidas em RPMI, sem a adição das amostras em estudo.

A densidade ótica celular média dos poços foi comparada com a densidade média dos poços de controlo. A concentração que provoca a diminuição de 50 % de viabilidade celular (IC₅₀) foi determinada a partir de uma regressão linear, por correlação da percentagem de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas.

A percentagem de viabilidade celular é obtida através da seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Absorvância}_{\text{amostra}} / \text{Absorvância}_{\text{controlo}}) \times 100$$

3.11.2 Biodisponibilidade e Permeação da Barreira Intestinal

As células são colocadas em *inserts* (normalmente de 10^3 a 10^5 células/cm²) constituídos por uma membrana porosa e permeável que permite a conexão entre o lado apical e o lado basolateral da monocamada permitindo o acesso a nutrientes e iões (Figura 35) ^[149]. Nestes *inserts* que se encontram dentro de um suporte, as células são deixadas a diferenciarem-se espontaneamente em enterócitos, mimetizando o epitélio gastrointestinal, normalmente por um período de 21 dias com mudança do meio de cultura a cada 48 h ^[150]. A monocamada de

células, confluentes e íntegras, gera uma resistência elétrica transepitelial (TEER), cujo valor é usado como controlo de uniformidade da monocamada e de junções intercelulares para o início dos testes, que consiste então na aplicação dos compostos em estudo ^[151].

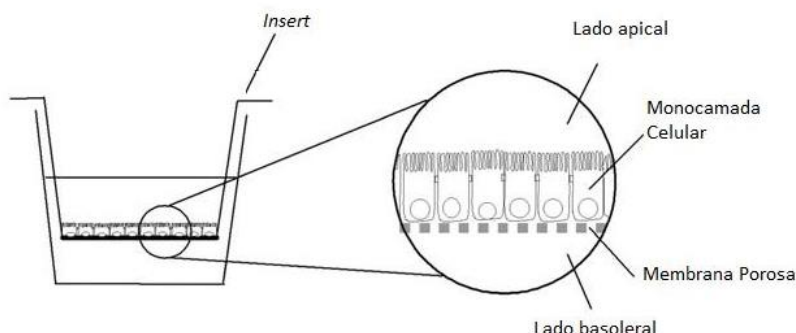


Figura 35: Representação esquemática do princípio básico de um ensaio em *Transwell*® - adaptado de [86].

Procedimento

Antes do ensaio nas *Transwell*®, a linha celular Caco-2 foi colocada a crescer e a desenvolver em frascos de cultura T75, em meio RPMI, numa estufa, a 37 °C contendo 5 % de CO₂. Para os ensaios de permeação, as células Caco-2 foram colocadas a crescer e a diferenciarem-se em placas *Transwell*® de 12 poços de acordo com o método de Falé (2011) ^[148], tendo sofrido algumas alterações. No lado apical foram colocados 500 µL de suspensão celular (5×10^4 células), uma vez que as membranas permeáveis que vão servir de suporte para o crescimento das células são sensíveis à densidade celular, por essa razão não convém ultrapassar a densidade de 10^4 células. No lado baso-lateral foi colocado 1,5 mL de meio RPMI. O meio, tanto do lado apical como do lado baso-lateral, foi mudado a cada 48 h. Ao fim de 23 dias, quando a confluência celular pretendida se verificou, foi avaliada a integridade das monocamadas formadas, recorrendo a um medidor de resistência da membrana. Para valores acima de 250 Ohm considera-se que a membrana se encontra nas condições ideais para a realização dos ensaios. O meio foi removido e tanto o lado apical como o baso-lateral, e foi lavado duas vezes com PBS 1x. Para a aplicação das amostras, no lado apical aplicou-se 600 µL de meio RPMI com extrato de outubro de 2015, numa concentração de 0,5 mg/mL, e na outra placa aplicou-se uma solução de sobrenadante resultante da precipitação de mucilagens (ponto 3.8.3) seguindo o mesmo procedimento, mas desta vez numa concentração de 0,25 mg/mL, tendo-se realizado para ambas as placas poços de controlo onde apenas foi colocado meio RPMI e no lado baso-lateral 1,6 mL de HBSS. Incubaram-se as amostras durante 24 h numa estufa a 37 °C contendo 5 % de CO₂.

As amostras foram recolhidas no tempo 0 h (quando foram colocadas as amostras) e no tempo 6h (passadas 6h da colocação das amostras) para posterior análise por HPLC-DAD. Depois das 6 h coletou-se a amostra do lado apical e baso-lateral e de seguida lavou-se a membrana com água MilliQ (2 × 200 µL), por último, para ressuspender as células adicionou-se 200 µL de água *Milli-Q*. Logo após a finalização da recolha das diferentes amostras estas foram imediatamente congeladas a -80 °C. Cada uma das amostras foi analisada por HPLC.

O cálculo do coeficiente de permeabilidade aparente foi calculado pela seguinte equação:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{1}{A} \times \frac{1}{C_0}$$

Onde: $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$ (µg/s) é a quantidade de um composto que é permeado pela membrana no tempo t, A é a área de exposição da membrana (cm²), e C_0 é a concentração inicial de composto presente na solução colocada em contato com a membrana (µg/mL).

3.11.3 Análise Eletroforética (SDS-PAGE) de Proteínas Totais Após Ensaio de Permeação nas Caco-2.

Antes de se aplicar as amostras no gel, é necessário fazer um prévio tratamento da amostra. Para tal, inicialmente descongelou-se as células de controlo, extrato e sobrenadante que se encontravam até então armazenadas a -80 °C (como descrito no ponto 3.11.2). Para rebentar as células, as amostras foram sonificadas durante 10 minutos, e depois centrifugadas a -4 °C a 12000 g durante 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante (150 µL) e fez-se quantificação de proteínas com 10 µL de amostra de acordo com o método descrito no ponto 3.9.4. Depois de quantificadas as proteínas do citosol existentes nos 10 µL de sobrenadante, retirou-se para um eppendorf o volume de sobrenadante correspondente a 20 µg/mL de proteínas. Cada amostra utilizada no ensaio teve uma concentração final de 20 µg de proteínas. As 20 µg de proteína foram precipitadas com dois volumes de acetona e deixou-se no frio durante 12 h. As amostras foram centrifugadas a -4 °C a 12000 g durante 10 minutos sendo de seguida secas com azoto de modo a ficar somente com o precipitado.

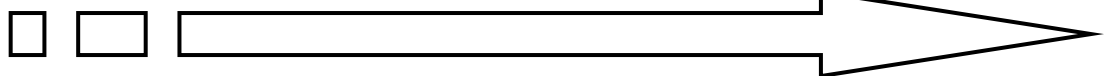
A eletroforese foi realizada num gel horizontal homogéneo de 4-12 % de acrilamida (45 x 80 x 1,4 mm), de acordo com o método da GE Healthcare Life Sciences ^[119]. Uma vez que o gel utilizado neste ensaio é pré feito, antes de aplicar as amostras no gel é essencial fazer-se uma corrida de 12 minutos a 160 V só com o gel e tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM e 0,1 % (m/v) SDS) de modo a hidratar o gel e a colocá-lo nas condições de corrida. O precipitado de proteína de cada uma das amostras foi dissolvido com tampão de amostra e

água numa proporção de ¼. Em cada um dos poços colocou-se 20 µL da amostra (com 20 µg de proteína) do citosol das células de controlo, extrato e sobrenadante. Além das amostras foi também adicionado em poços adjacentes 20 µL de marcador e de tampão de amostra. A separação eletroforética foi desenvolvida a 160 V durante 80 minutos. Após concluída a eletroforese, o gel foi corado com *BlueSafe*. Para a coloração, o gel foi submetido por uma hora à solução corante. Quando finalizada a coloração das proteínas, foi obtida a respetiva imagem através do aparelho fotográfico *ImageQuant*.

3.12 Análise Estatística de Resultados

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Microsoft® Office Excel 2007, com resultados expresso em média ± desvio padrão. O tratamento das imagens dos géis foi feito com o programa ImageJ. A análise dos espetros e massa foi feita recorrendo ao *software* Xcalibur®. O tratamento estatístico dos resultados foi realizado usando a análise de variância, “one-way ANOVA” e o teste t.

Capítulo IV – Apresentação e Discussão de Resultados



4.1 Quantificação de Metabolitos Presentes nos Extratos Aquosos de Folhas de *Actinidia deliciosa* Durante Diferentes Estágios de Desenvolvimento da Folha.

As folhas de *Actinidia deliciosa* foram recolhidas em diferentes períodos do ano (ponto 3.4), a partir destas folhas fez-se a extração de compostos bioativos com água através de um processo de decocção (de acordo com o ponto 3.5). O extrato aquoso de cada amostra, foi analisado quanto à sua composição em fenóis totais, taninos, proteínas, açúcares redutores e mucilagem. A análise química das folhas recolhidas em diferentes épocas do ano, teve como objetivo avaliar de que modo os diferentes estágios de desenvolvimento da planta (desde o aparecimento das primeiras folhas até à fase final da poda) influenciariam a sua composição em compostos bioativos.

O foco deste trabalho não se centra somente na caracterização de compostos bioativos das folhas de *Actinidia deliciosa*, mas também na avaliação das suas atividades biológicas inerentes. Assim, tanto a análise da composição, como a avaliação das atividades biológicas permitirá verificar se as folhas de *Actinidia deliciosa* apresentaram características interessantes para serem aproveitadas pela indústria alimentar/farmacêutica, principalmente as folhas recolhidas na altura da poda da planta, uma vez que é neste estágio que realmente as folhas da planta se tornam desperdícios, até lá as folhas são importantes para a subsistência tanto da planta como do próprio fruto.

4.1.1 Fenóis Totais

O metabolismo secundário das plantas é consideravelmente influenciado pelo grau de maturação momento da colheita, bem como por fatores ambientais ^{[4], [6], [152]}. Fatores ambientais, como tipo de solo, a exposição ao sol, precipitação, tem um efeito importante sobre teor de polifenóis. A exposição à luz tem um efeito considerável sobre a maioria dos flavonoides. O grau de maturação afeta consideravelmente as concentrações e proporções dos vários polifenóis ^{[4], [6]}.

A quantificação dos fenóis totais para os diferentes extratos de *Actinidia deliciosa* foi feita de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (ponto 3.9.1). Para cada extrato analisado foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições (Figura 36).

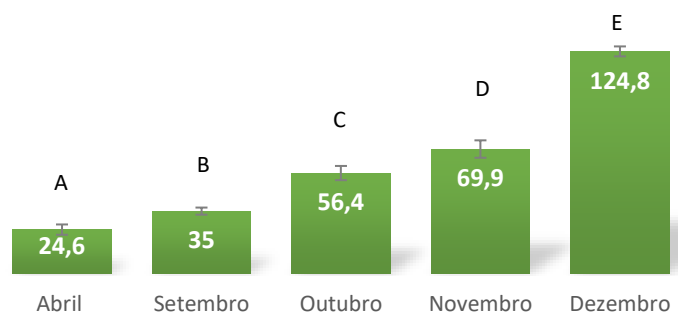


Figura 36: Conteúdo em fenóis totais dos diferentes extratos. Valores expressos em µg equiv. de ácido gálico/mg extrato. A, B, C, D e E são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.

Na Figura 36 verifica-se um forte aumento na composição em fenóis totais de mês para mês, denotando-se um maior aumento, de 78,5 %, entre os meses de novembro e dezembro, seguido de 61,1 % durante os meses de setembro a outubro. Analisando os valores obtidos para fase inicial (aparecimento das primeiras folhas) e a altura final (altura do início da poda) verifica-se um aumento de aproximadamente 407 %, valor este muito significativo e que consegue ilustrar a grande diferença entre o estágio inicial e final da folha. Estes resultados revelam que na altura da poda da planta (dezembro), as folhas de *Actinidia deliciosa* estão num elevado estágio de maturação, com isso, a quantidade de compostos fenólicos é significativamente maior quando comparados com os outros extratos.

4.1.2 Taninos

A quantificação dos taninos para os diferentes extratos de *Actinidia deliciosa* foi feita de acordo com o método descrito no ponto 3.9.2. Para cada extrato analisado foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições (Figura 37).

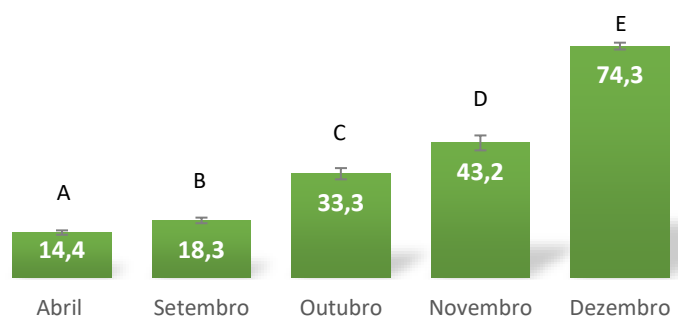


Figura 37: Conteúdo em taninos dos diferentes extratos. Valores expressos em µg equiv. de ácido tânico/mg extrato. A, B, C, D e E são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.

Os resultados adquiridos, para o conteúdo de cada extrato em taninos, revelaram um perfil muito parecido ao obtido anteriormente para os fenóis totais. Tal como acontecia para os fenóis, também nos taninos se verificou um aumento mais significativo, 72 %, entre os meses de novembro e dezembro. E tal como se verificava anteriormente, entre a fase inicial e final da folha, o aumento na composição em taninos dos diferentes extratos é de aproximadamente 416 %.

Na literatura, tem sido demonstrado que na fase de maturação da folha, o teor em compostos fenólicos tem tendência a aumentar ^{[153], [154]}, resultado que está concordante com os resultados obtidos neste trabalho.

4.1.3 Açúcares Redutores

A quantificação de açúcares nos vários extratos de *Actinidia deliciosa* foi desenvolvida de acordo com o método DNS (ponto 3.9.3), sendo este um método usualmente empregue para o doseamento de açúcares redutores. Para cada extrato analisado foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições (Figura 38).

Todos os monossacáridos são redutores, e a maioria dos dissacáridos e oligossacáridos têm propriedades redutoras ^[155]. Para um açúcar ser redutor é necessário que tenham pelo menos um carbono anomérico livre. A lactose por exemplo, é um dissacárido redutor, ao contrário da sacarose, que é considerado um dissacárido não redutor porque os carbonos anoméricos estão envolvidos na ligação glicosídica. No entanto por hidrólise ácida ou por ação de enzimas, os açúcares não redutores podem ficar com propriedades redutores.

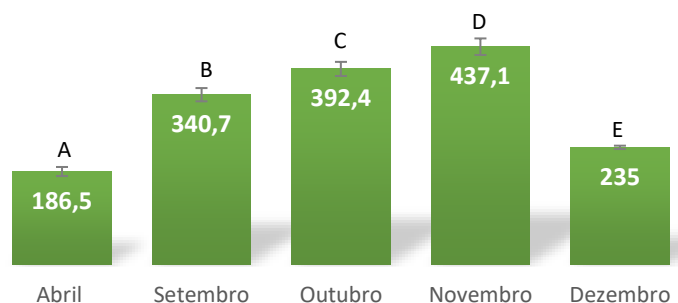


Figura 38: Conteúdo em açúcares redutores dos diferentes extratos. Valores expressos em µg/mg extrato. A, B, C, D e E são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.

Os açúcares redutores são os principais açúcares solúveis nas folhas, sendo responsável por mais de 74 % da composição em açúcar total ^[155]. Analisando a Figura 38 verifica-se que o aumento mais significativo, dá-se entre abril e setembro (82,7 %), aumentando até novembro, acabando por diminuir consideravelmente em dezembro (46,2 %), sendo esta a fase final da maturação da folha. Como vem sendo reportado pela literatura para outras plantas, tem-se verificado que o teor de açúcar nas folhas apresenta uma correlação positiva durante o estágio intermédio de maturação da folha, e uma correlação negativa na fase final de desenvolvimento da folha ^[155]. Os resultados reportados pela literatura estão concordantes com os adquiridos para os extratos aquosos da folha de *Actinidia deliciosa*.

4.1.4 Proteínas

A quantificação de proteínas nos vários extratos de *Actinidia Deliciosa*, foi feita de acordo com o método de Bradford descrito no ponto 3.9.4. Para cada extrato analisado foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições (Figura 39).

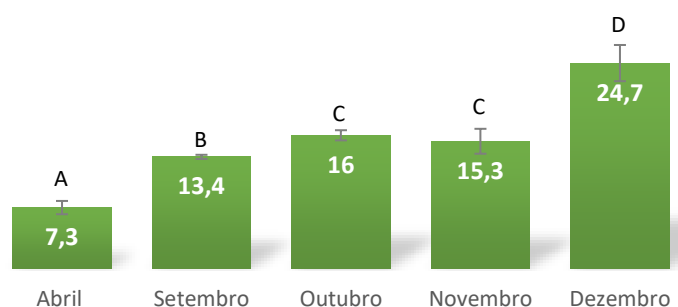


Figura 39: Conteúdo em proteínas para os diferentes extratos. Valores expressos em µg/mg extrato. A, B, C e D são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.

Dos resultados obtidos (Figura 39), é possível constatar que o teor em proteína no extrato denota um aumento de 61,4 % entre os meses de novembro a dezembro. Comparando a teor em proteína na fase inicial da folha (abril) na fase final (dezembro) verifica-se um aumento bastante considerável de 238,4 %.

4.1.5 Mucilagem

A quantificação foi feita após a precipitação de cada extrato com etanol, de acordo com o ponto 3.9.5. Os valores obtidos para cada extrato estão representados na Figura 40. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

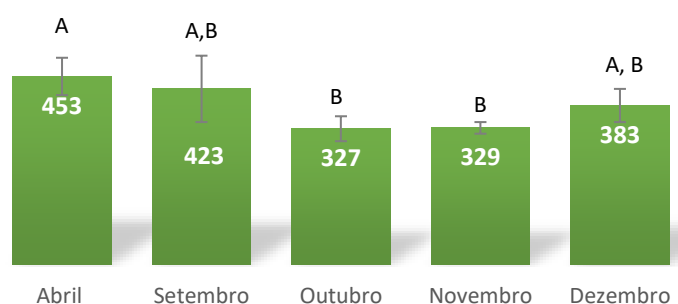


Figura 40: Conteúdo em mucilagem para os diferentes extratos. Valores expressos em µg/mg extrato. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.

Quanto ao conteúdo em mucilagem, de cada um dos extratos analisados, é possível verificar que a folha de *Actinidia deliciosa* apresenta na sua composição elevada concentração mucilagem (≈ 40 % do extrato). De acordo com a literatura, em extratos aquosos além de compostos fenólicos, também mucilagens estão presentes ^[156], e em algumas espécies de plantas a concentração encontrada nas folhas é consideravelmente elevada ^[157].

4.1.6 Análise Comparativa dos Diferentes Metabolitos Presentes nos Extratos Aquosos de Folhas de *Actinidia deliciosa*

Analisando os resultados obtidos (Figura 36-40), é possível constatar que o extrato aquoso da folha de *Actinidia deliciosa* recolhida no mês de dezembro é, comparativamente com as outras com os outros extratos, o que apresenta maior quantidade de compostos bioativos, entre os quais, fenóis, taninos e proteínas. Em dezembro, a folha de *Actinidia deliciosa* começa a cair (maturação máxima da folha - começo da poda da planta), durante a poda da planta as

folhas não são, como já foi referido, aproveitadas, tornando-se resíduos agrícolas. Assim para a seu aproveitamento, numa primeira análise os resultados são favoráveis, no entanto é preciso identificar que compostos fenólicos estão presentes no extrato, e avaliar as suas atividades biológicas, para ver se tem interesse para a indústria alimentar/farmacêutica.

4.2 Influência de Processos de Purificação, sobre a Composição Química do Extrato de *Actinidia deliciosa*

Os compostos fenólicos são compostos com atividades biológicas muito interessantes, entre as quais, atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígeno, entre outros. Muitas das vezes, a concentração de compostos fenólicos por miligrama de extrato é relativamente baixa pela existência de outros compostos presentes na matriz, assim torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de purificação que permitam eliminar alguns dos compostos da matriz, que não sejam de origem fenólica, e concentrar estes compostos.

4.2.1 Estudo do Método de Purificação para o Extrato Aquoso de *Actinidia deliciosa* de abril

Para o extrato liofilizado das folhas de *Actinidia deliciosa*, foram aplicados três métodos de purificação, usando cromatografia de fase reversa (extração em fase sólida (SPE) e recolha de frações por HPLC), e precipitação de mucilagens. Depois de avaliado o melhor processo este será aplicado aos restantes extratos. A razão pela qual se escolheu o extrato de abril, foi pela elevada proporção de mucilagens relativamente aos compostos fenólicos de 18,4. Para os restantes extratos a proporção (mucilagens/fenóis totais) esteve entre 3,1 e 12.

Os três diferentes processos de purificação, foram avaliados através da análise HPLC-DAD (ponto 3.6), quantificação de fenóis totais (ponto 3.9.1) e taninos (ponto 3.9.2), e pela avaliação da atividade antioxidante de acordo com o método do DPPH ponto 3.10.1.1). Os resultados são mostrados na Figura 41.

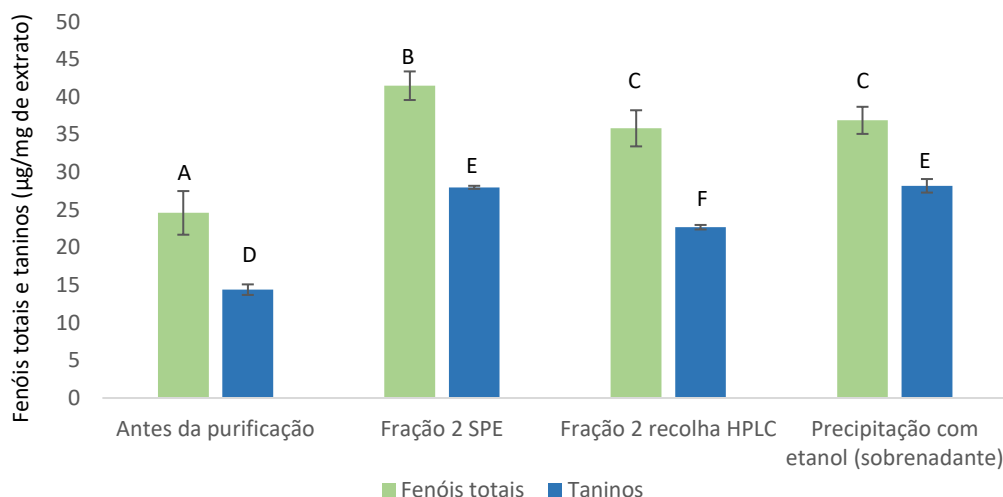
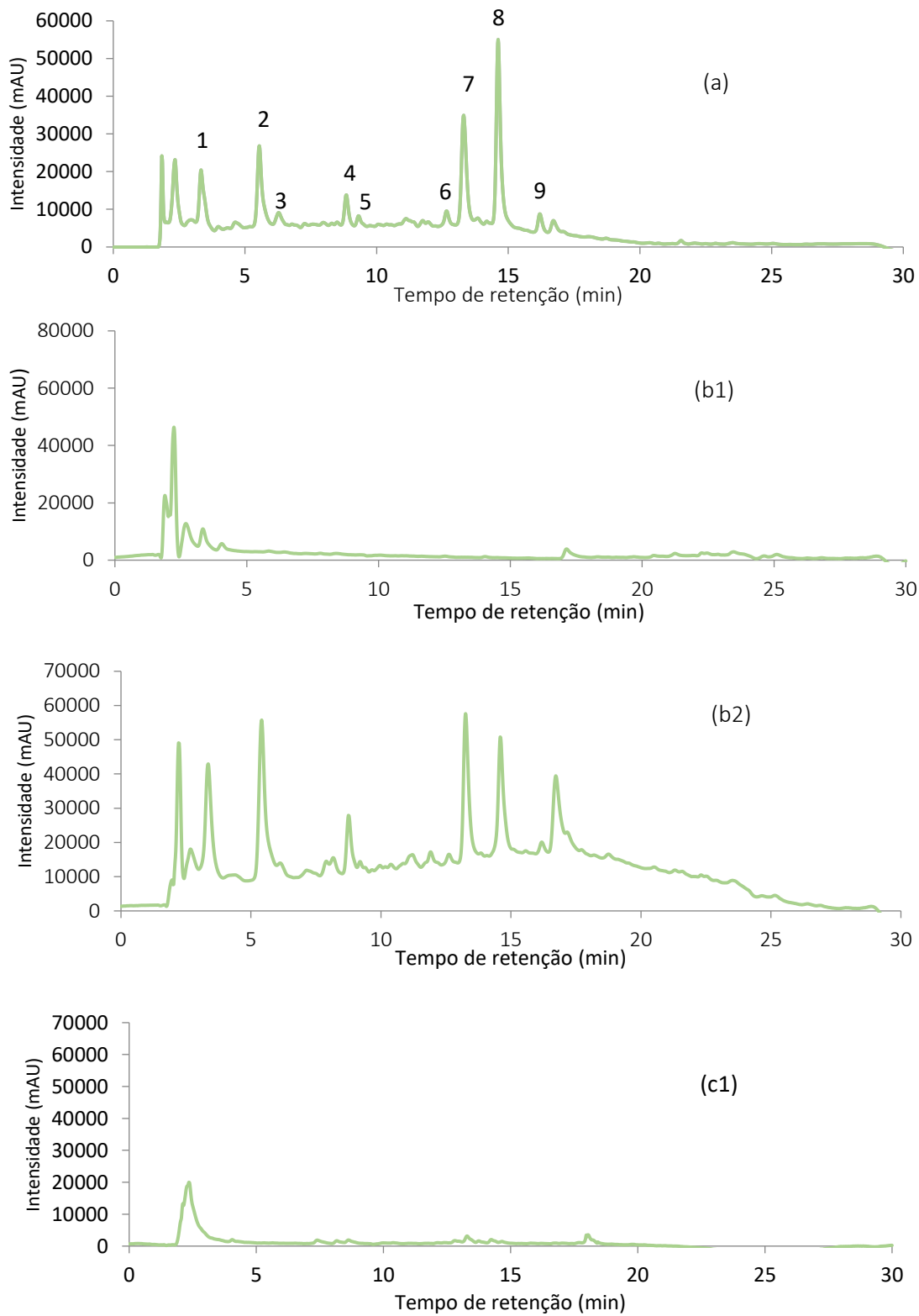


Figura 41: Quantificação de fenóis totais e taninos para cada um dos métodos de purificação, fração 2 da SPE e da recolhida por HPLC, e sobrenadante da precipitação com etanol. Para os fenóis totais A, B, e C, e para os taninos D, E e F, são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.

De acordo com a Figura 41, na fração 2 da SPE (recolhida da eluição dos compostos fenólicos), verificou-se um aumento de 68,7 % de fenóis (24,6 µg/mg e 41,5 µg/mg, antes e depois da purificação, respetivamente) e 94,4 % em taninos (14,4 µg/mg e 28 µg/mg, antes e depois purificação, respetivamente). Por outro lado, na fração 2 recolhida do HPLC verificou-se um aumento de 45,5 % de fenóis totais (24,6 µg/mg e 35,8 µg/mg, antes e depois da purificação, respetivamente) e 57,6 % em taninos (14,4 µg/mg e 22,7 µg/mg, antes e depois da purificação, respetivamente). Para o sobrenadante resultante da precipitação com etanol verificou-se um aumento de 50 % de fenóis totais (24,6 µg/mg e 36,9 µg/mg, antes e depois da purificação, respetivamente) e 95,8 % em taninos (14,4 µg/mg e 28,2 µg/mg, antes e depois da purificação, respetivamente).

As frações obtidas após purificação foram analisadas por HPLC-DAD (Figura 42). O extrato inicial revelou a existência de nove compostos principais (Figura 42a).



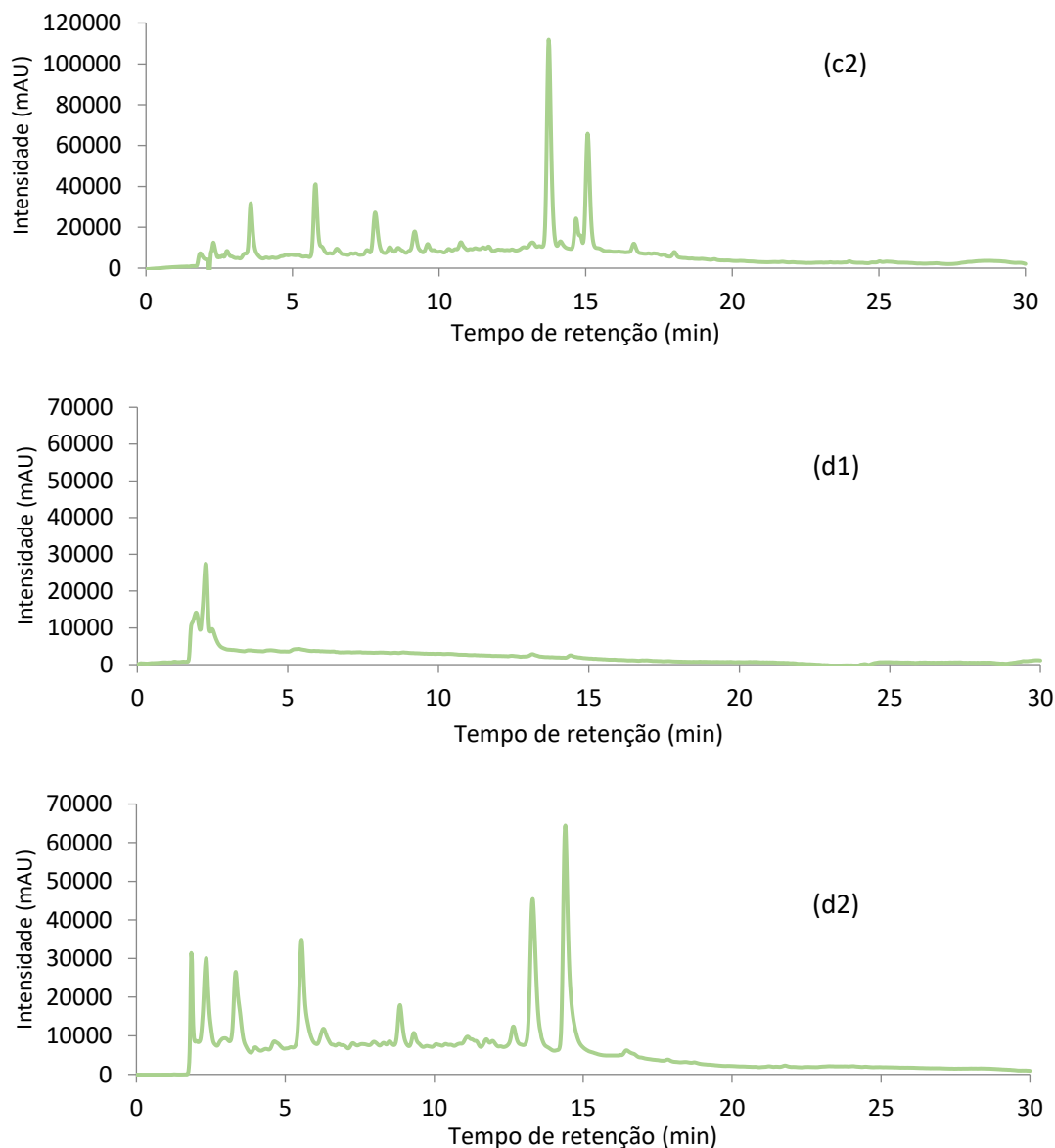


Figura 42: RP-HPLC do extrato de abril inicial de *Actinidia deliciosa* (a) e frações obtidas para cada um dos processos de purificação, SPE: (b1) primeira fração, (b2) segunda fração; recolha de HPLC: (c1) primeira fração (c2) segunda fração; e precipitação com etanol: (d1) fase sólida precipitada (mucilagem), (d2) sobrenadante.

Para o SPE, obtiveram-se duas frações, a fração 1 recolhida durante a permeação da amostra e a fração 2 durante a eluição dos analitos a partir do cartucho. Os cromatogramas adquiridos para a fração 1 e 2 estão representados na Figura 42b1 e Figura 42b2, respetivamente. Na fração 1 é possível verificar a presença de picos presentes no extrato inicial, no entanto, apresentam intensidades muito baixas, já a fração 2 apresenta o perfil cromatográfico idêntico à amostra antes da purificação, embora com os compostos fenólicos em diferentes proporções. A purificação por HPLC-DAD, exibiu o mesmo perfil adquirido as frações do SPE (Figuras 42c1-42c2). Na fração de precipitado (mucilagem) não foram detetados picos correspondentes aos compostos fenólicos (Figura 42d1). Na fração de

sobrenadante estão presentes compostos fenólicos, e como acontecia para as outras duas técnicas, com certos compostos mais concentrados por miligrama de extrato (Figura 42d2).

Os cromatogramas das frações fenólicas (Figura 42b2, 42c2 e 42d2), obtidas para cada um dos processos de purificação revelaram a persistência dos nove compostos principais (Figura 42a) presentes no extrato inicial de *Actinidia deliciosa*, mas em diferentes proporções. Feita a análise das intensidades dos picos dos diferentes cromatogramas é possível ver o efeito da purificação na proporção dos diferentes compostos relativamente ao extrato inicial Tabela 3.

Tabela 3: intensidades relativas de cada composto, para cada um dos métodos de purificação. ^a +++ três vezes mais concentrado, ++ duas vezes mais concentrado, + mais concentrado, – menos concentrado relativamente ao extrato inicial da *Actinidia deliciosa*.

Composto	Métodos de purificação		
	SPE ^a	Recolha HPLC ^a	Precipitação com etanol ^a
1	++	+	+
2	++	+	+
3	-	-	+
4	++	+	+
5	+	+	+
6	-	+	+
7	+	+++	+
8	-	+	+
9	-	-	-

Após a purificação pelo SPE, a proporção relativa dos compostos 1, 2, 4 aumentou duas vezes relativamente ao extrato inicial, os compostos 5 e 7, também viram aumentada a sua proporção, mas não com uma proporção tão elevada (Figura 42b2). No caso da recolha por HPLC-DAD, a proporção do composto 7 aumentou três vezes (Figura 42c2). No processo de precipitação com etanol, todos os compostos, com a exceção do composto 9, foram concentrados. O composto 9 foi o único composto que não concentrou nos três processos.

Com base nos resultados, é possível verificar que a fração resultante da precipitação com etanol, foi a que concentrou mais compostos fenólicos, enquanto que as outras duas frações apesar de terem concentrado em maior proporção alguns dos compostos, outros não concentraram (Tabela 3). Estes resultados podem assim vir a influenciar consideravelmente, as atividades biológicas de cada uma das frações resultantes da purificação. Assim é importante salientar, que não interessa somente concentrar os compostos fenólicos por miligrama de extrato, mas como também, conseguir otimizar ao máximo as atividades biológicas da amostra depois do processo de purificação.

A atividade antioxidante do extrato inicial de abril e das frações fenólicas de cada um dos processos de purificação foi determinada de acordo com o ensaio do DPPH, e os resultados estão representados na Figura 43.

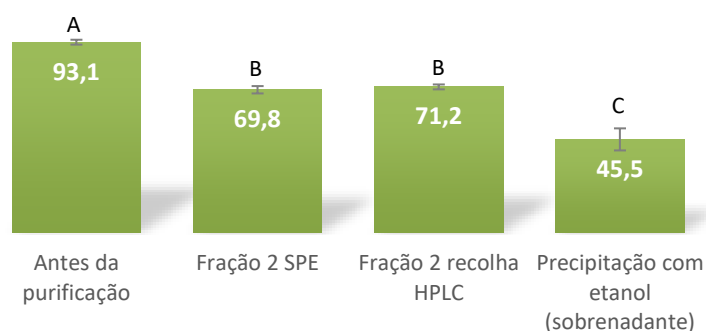


Figura 43: Valores de EC₅₀ (µg/mL) para a atividade antioxidante, de acordo com o método do DPPH, para o extrato inicial de abril e para as frações fenólicas de cada um dos processos de purificação. A, B e C são estatisticamente diferentes para um nível de confiança de 95 %.

Analisando os resultados presentes na Figura 43, é possível verificar que para os três processos de purificação, como seria de esperar, houve uma diminuição dos valores de EC₅₀ em relação ao extrato inicial. Os valores de EC₅₀ para a fração 2 do SPE e da recolha HPLC foram muito semelhantes, representando um aumento da atividade antioxidante de aproximadamente 24,3 %. Para o sobrenadante resultante da precipitação com etanol o aumento da atividade antioxidante foi ainda mais pronunciado de 51,1 %. O método de purificação por precipitação das mucilagens com etanol, revelou ser de entre os três métodos o mais promissor, além de se conseguir obter frações com elevada quantidade de compostos fenólicos por miligrama de extrato, a atividade antioxidante resultante é consideravelmente melhor quando comparada com os outros dois métodos. Relativamente ao SPE e à recolha por HPLC, a precipitação da amostra com etanol é um método mais barato e permite a utilização de grandes volumes de amostras. De entre os três processos, a recolha por HPLC é um método consideravelmente mais demorado ^{[157], [158]}.

De acordo com a literatura, extratos que na sua composição apresentam elevados teores de taninos, apresentam maior atividade antioxidante ^[159]. Estes dados ajudam a explicar a grande diferença, cerca de 25 %, na atividade antioxidante da fração resultante da precipitação das mucilagens, comparativamente à fração 2 do SPE e da recolha por HPLC. Ao analisar a Figura 41, é possível verificar que o sobrenadante contém maior quantidade de taninos por micrograma de fenóis totais, quando comparados com as frações 2 do SPE e da recolha por HPLC.

4.2.2 Estudo do Processo de Purificação por Precipitação com Etanol dos Diferentes Extratos de *Actinidia deliciosa*

Para verificar a reprodutibilidade do método de purificação por precipitação das mucilagens com etanol, os restantes extratos de *Actinidia deliciosa* (setembro, outubro, novembro e dezembro) foram precipitadas com etanol. Para cada uma das frações obtidas, mucilagem e sobrenadante, foi feita a análise cromatográfica, a quantificação de fenóis totais, taninos e avaliada a atividade antioxidante de acordo com o método do DPPH (Tabelas 4, 5, 6 e 7). Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

Soluções de 1 mg/mL de sobrenadante e mucilagem dos diferentes extratos (setembro, outubro, novembro e dezembro), foram injetadas no HPLC (de acordo com o ponto 3.6). A análise cromatográfica da amostra antes, e das duas frações resultantes da purificação estão representadas da Figura 44 à Figura 55.

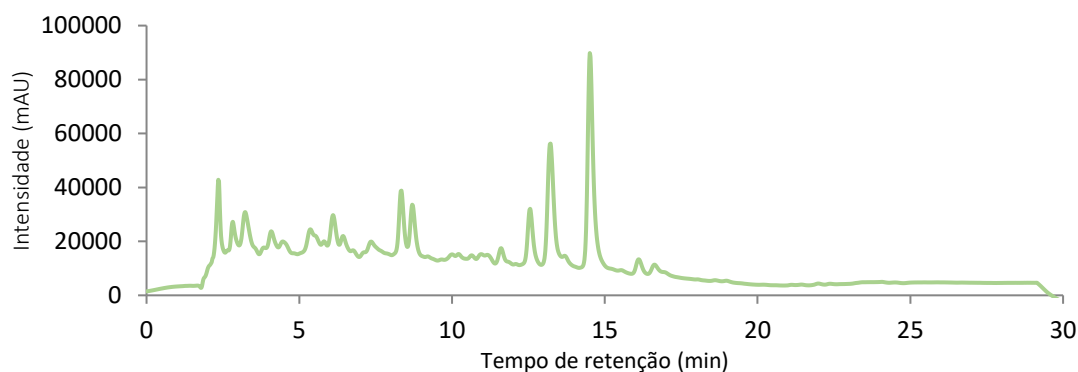


Figura 44: Cromatograma (DAD) do extrato de setembro de 2015.

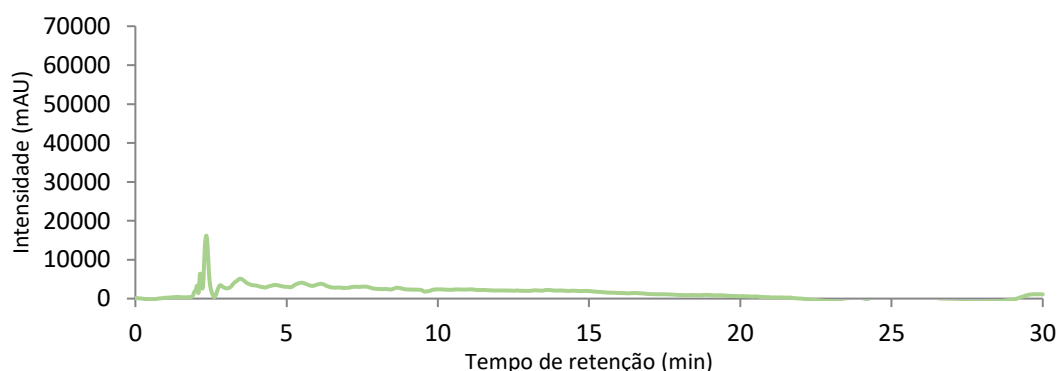


Figura 45: Cromatograma (DAD) das mucilagens do extrato de setembro de 2015.

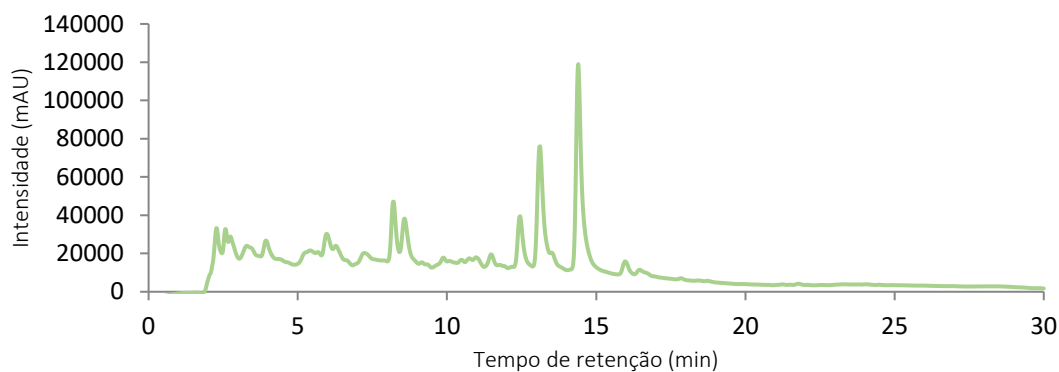


Figura 46: Cromatograma (DAD) do sobrenadante do extrato de setembro de 2015.

Examinando os cromatogramas obtidos para as diferentes amostras, é possível verificar que o perfil cromatográfico do extrato inicial se mantém no sobrenadante. Quantitativamente no sobrenadante, foram obtidos compostos fenólicos em maior proporção comparativamente ao extrato inicial. Na mucilagem foram detetados alguns picos de intensidade muitíssimo baixa correspondentes a compostos fenólicos. Além disso, na Tabela 4 é possível verificar que na mucilagem ficaram adsorvidos alguns compostos fenólicos (aproximadamente 10 %), mesmo depois de feitas várias lavagens. A percentagem de compostos fenólicos na mucilagem foi muito baixa, o que impossibilitou a determinação do valor de EC_{50} para a atividade antioxidante. A quantidade de fenóis por miligramas de extrato no sobrenadante aumentou, aproximadamente 63 %, o que levou a um aumento da atividade antioxidante, resultado de um valor de EC_{50} mais baixo.

Tabela 4: Quantificação de fenóis totais (μg equiv. de ácido gálico/mg de extrato), taninos (μg equiv. ácido tânico/mg de extrato), e determinação de atividade antioxidante ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para o sobrenadante e mucilagem, resultantes da precipitação do extrato de setembro 2015.

Amostra	Fenóis totais	Taninos	EC_{50} DPPH
Antes da purificação	35 ± 2	$18,3 \pm 0,9$	$47,9 \pm 2,9$
Sobrenadante	$57,1 \pm 6$	$48,8 \pm 4,7$	$24,7 \pm 4,8$
Mucilagem	$3,7 \pm 0,7$	$2,8 \pm 1,5$	-

Da precipitação com o etanol do extrato de outubro resultaram duas frações, o sobrenadante e a mucilagem. A análise cromatográfica da amostra antes, e das duas frações resultantes da purificação estão representadas nas Figuras 47-49.

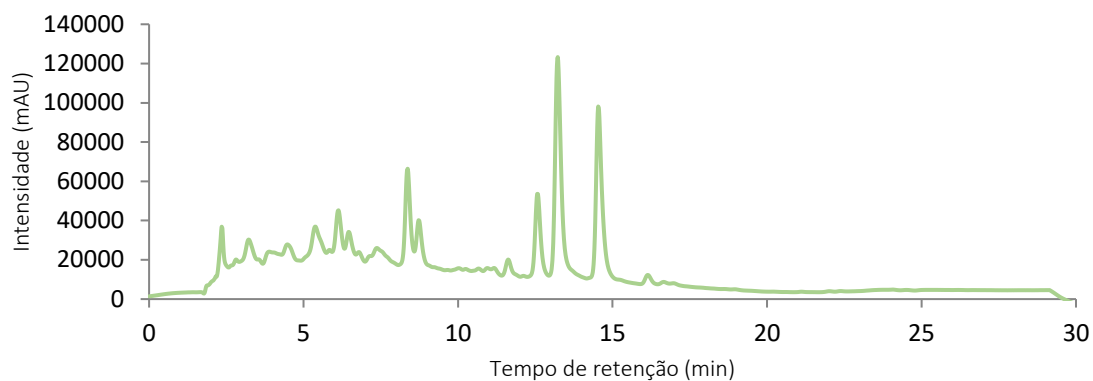


Figura 47: Cromatograma (DAD) do extrato de outubro de 2015.

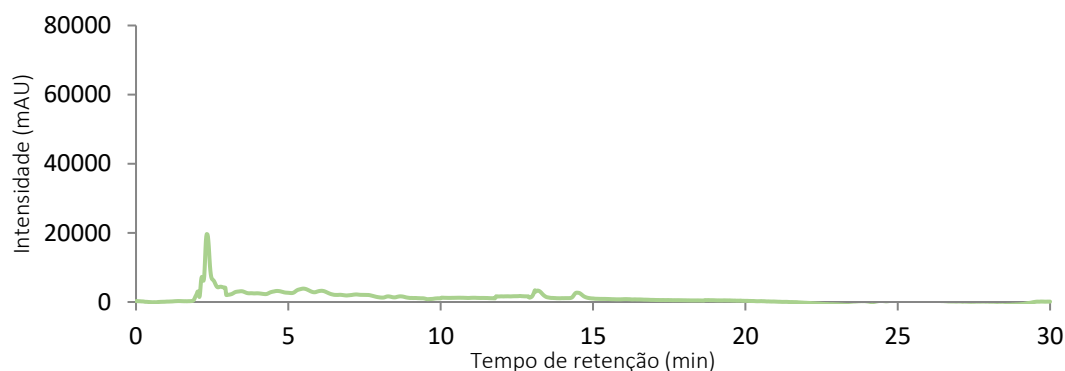


Figura 48: Cromatograma (DAD) das mucilagens do extrato de outubro de 2015.

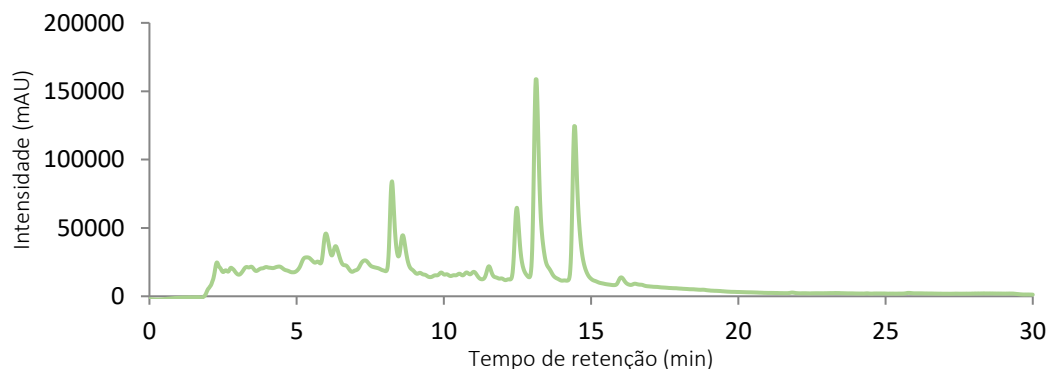


Figura 49: Cromatograma (DAD) do sobrenadante do extrato de outubro de 2015.

De acordo com os cromatogramas obtidos para as diferentes amostras, é possível verificar que o perfil cromatográfico do extrato inicial se mantém no sobrenadante. Quantitativamente no sobrenadante, foram obtidos compostos fenólicos em maior proporção comparativamente ao extrato inicial, tal como se verificava para o extrato de setembro. Na mucilagem foram detetados alguns picos de intensidade muitíssimo baixa correspondentes a compostos fenólicos. Além disso, na Tabela 5 é possível verificar que na mucilagem ficaram adsorvidos alguns compostos fenólicos (aproximadamente 7,8 %), mesmo depois de feitas várias lavagens. A percentagem de compostos fenólicos na mucilagem foi muito baixa, o que impossibilitou a

determinação do valor de EC_{50} para a atividade antioxidante. A quantidade de fenóis por miligramas de extrato no sobrenadante aumentou, aproximadamente 41,7 %, o que levou a um aumento da atividade antioxidante resultado de um valor de EC_{50} mais baixo. Na mucilagem não foi possível determinar o valor de EC_{50} , devido ao baixo conteúdo em fenóis totais.

Tabela 5: Fenóis totais (μg equiv. de ácido gálico/mg de extrato), taninos (μg equiv. ácido tânico/mg de extrato) e atividade antioxidante ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para a solução de sobrenadante, mucilagem a partir do extrato de outubro de 2015.

Amostra	Fenóis totais	Taninos	EC_{50} DPPH
Antes da purificação	$56,4 \pm 4$	$33,3 \pm 1,8$	$27,4 \pm 1,6$
Sobrenadante	$79,9 \pm 1,1$	$57,5 \pm 3,9$	$19,1 \pm 1,1$
Mucilagem	$4,4 \pm 1,2$	$3 \pm 1,3$	-

Da precipitação com o etanol do extrato de novembro resultaram duas frações, o sobrenadante e a mucilagem. A análise cromatográfica da amostra antes, e das duas frações resultantes da purificação estão representadas nas Figuras 50-52.

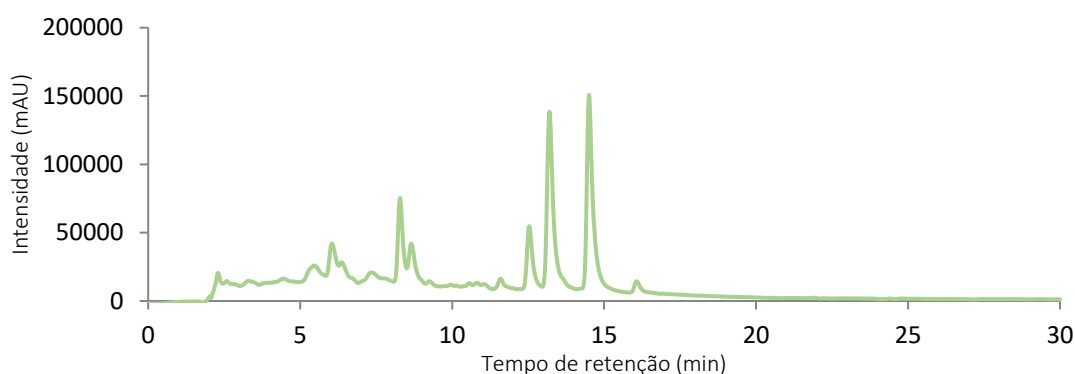


Figura 50: Cromatograma (DAD) do extrato de novembro de 2015.

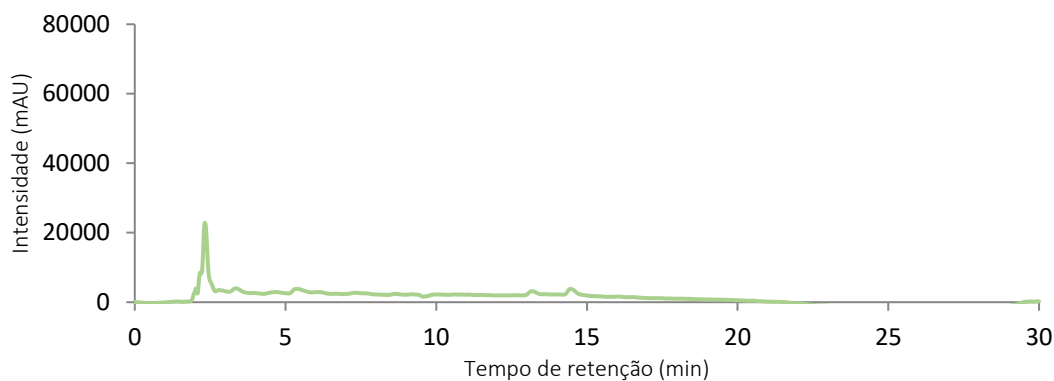


Figura 51: Cromatograma (DAD) das mucilagens do extrato de novembro de 2015.

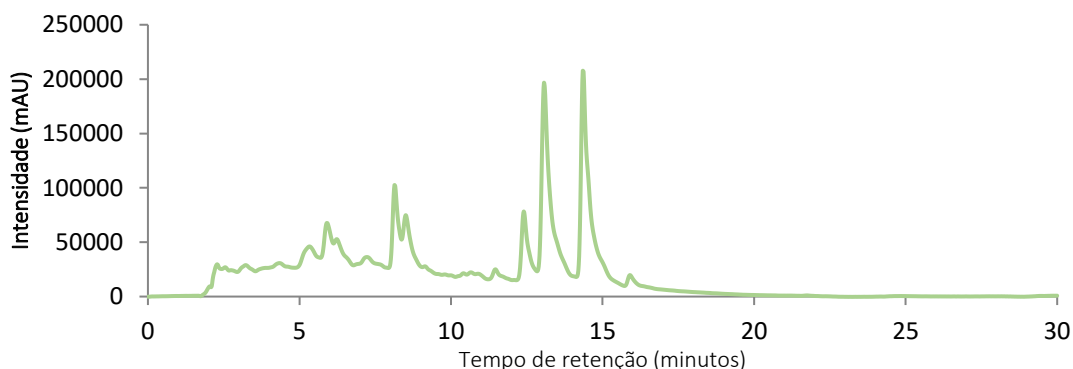


Figura 52: Cromatograma (DAD) do sobrenadante do extrato de novembro de 2015.

Dos resultados obtidos da análise cromatográfica, para a precipitação das mucilagens do extrato de novembro, é possível retirar as mesmas conclusões previamente discutidas para o extrato de setembro e outubro.

Na tabela 6 é possível verificar que na mucilagem ficaram adsorvidos alguns compostos fenólicos (aproximadamente 5,4 %), mesmo depois de feitas várias lavagens. A percentagem de compostos fenólicos na mucilagem foi muito baixa, o que impossibilitou a determinação do valor de EC_{50} para a atividade antioxidante. A quantidade de fenóis por miligramas de extrato no sobrenadante aumentou, aproximadamente 24,5 %, o que levou a um aumento da atividade antioxidante resultado de um valor de EC_{50} mais baixo. Na mucilagem não foi possível determinar o valor de EC_{50} , devido ao baixo conteúdo em fenóis totais.

Tabela 6: Fenóis totais (μg equiv. de ácido gálico/mg de extrato), taninos (μg equiv. de ácido tânico/mg de extrato) e atividade antioxidante ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para a solução de sobrenadante, mucilagem a partir do extrato de novembro de 2015.

Amostra	Fenóis totais	Taninos	EC ₅₀ DPPH
Antes da purificação	69,9 \pm 4,9	43,2 \pm 2,4	20,9 \pm 1,3
Sobrenadante	87 \pm 2	80 \pm 1,1	17,9 \pm 0,7
Mucilagem	3,8 \pm 1,4	1 \pm 1,2	-

Da precipitação com o etanol do extrato de dezembro resultaram duas frações, o sobrenadante e a mucilagem. A análise cromatográfica da amostra antes, e das duas frações resultantes da purificação estão representadas nas Figuras 53-55.

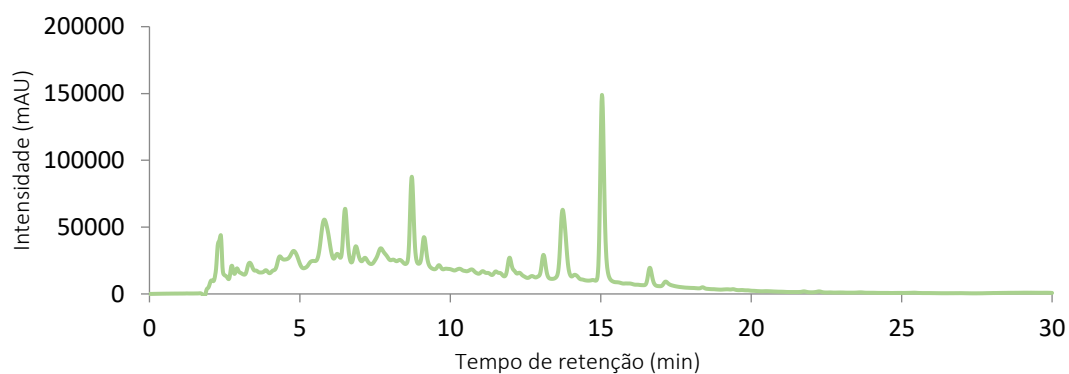


Figura 53: Cromatograma (DAD) do extrato de dezembro de 2015.

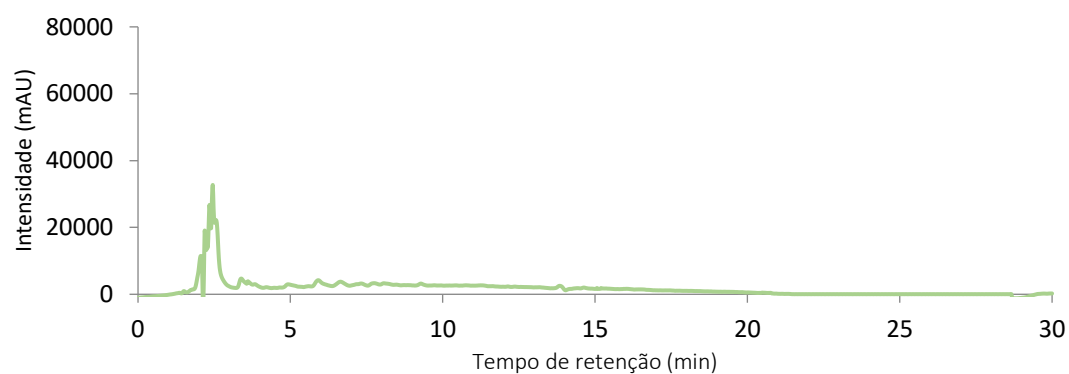


Figura 54: Cromatograma (DAD) das mucilagens do extrato de dezembro de 2015.

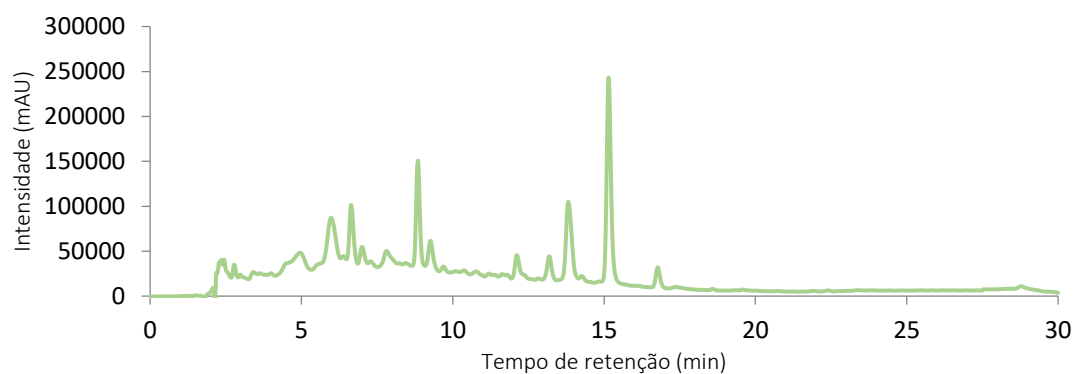


Figura 55: Cromatograma (DAD) do sobrenadante do extrato de dezembro de 2015.

Dos resultados obtidos da análise cromatográfica, para a precipitação das mucilagens do extrato de novembro, é possível retirar as mesmas conclusões previamente discutidas para o extrato de setembro, outubro e novembro.

Na tabela 7 é possível verificar que na mucilagem ficaram adsorvidos alguns compostos fenólicos (aproximadamente 5 %), mesmo depois de feitas várias lavagens. A percentagem de compostos fenólicos na mucilagem foi muito baixa, o que impossibilitou a determinação do valor de EC_{50} para a atividade antioxidante. A quantidade de fenóis por miligramas de extrato no sobrenadante aumentou, aproximadamente 26 %, o que levou a um aumento da atividade antioxidante resultado de um valor de EC_{50} mais baixo. Na mucilagem não foi possível determinar o valor de EC_{50} , devido ao baixo conteúdo em fenóis totais.

Tabela 7: Fenóis totais (μg equiv. de ácido gálico/mg de extrato), taninos (μg equiv. de ácido tânico/mg de extrato) e atividade antioxidante ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para a solução de sobrenadante, mucilagem a partir do extrato de dezembro de 2015.

Amostra	Fenóis totais	Taninos	EC_{50} DPPH
Antes da purificação	$124,8 \pm 2,8$	$74,3 \pm 1,1$	$12,8 \pm 1,8$
Sobrenadante	$157,1 \pm 5,9$	$107 \pm 1,2$	$9,4 \pm 0,8$
Mucilagem	$6,2 \pm 1,1$	$4,7 \pm 1,4$	-

De acordo com os dados adquiridos anteriormente, para as diferentes amostras, é possível concluir que, o processo de purificação com etanol, é um método reprodutível e a partir do qual se consegue obter frações (sobrenadantes) com maior quantidade de compostos fenólicos por miligrama de extrato, comparativamente ao extrato antes da purificação. No entanto, o aumento mais notório foi obtido para o sobrenadante do extrato de setembro ($\approx 63\%$), porém, nesse mesmo extrato verificou-se uma maior perda de compostos fenólicos para a

mucilagem ($\approx 10\%$). Já que a fração de sobrenadante concentrou em compostos fenólicos, a atividade antioxidante, de acordo com o método do DPPH, também foi melhorada obtendo-se valores de EC_{50} mais baixos. Estes resultados corroboram outros estudos, na qual a atividade antioxidante foi também relacionada com o teor de fenóis ^[160].

4.3 Análise das Mucilagens por FTIR

A fim de ter algum conhecimento sobre os grupos funcionais presentes na mucilagem, foi feita a análise FTIR ao precipitado resultante da precipitação com etanol. Inúmeros artigos têm sido desenvolvidos para a caracterização de mucilagens extraídas de plantas por FTIR ^{[5], [54], [161], [162]}. O espectro de FTIR da mucilagem presente nas folhas de *Actinidia deliciosa* exibe bandas e picos característicos da mucilagem, e estes foram atribuídos a grupos funcionais de acordo com a bibliografia (Figura 56, Tabela 8) ^{[5], [54], [161], [162]}. A análise FTIR revelou que a mucilagem contém grandes grupos funcionais e estruturais, tais como grupos hidroxilo poliméricos, alcanos e grupos carboxilatos que asseguram a presença da cadeia polimérica na mucilagem ^[54].

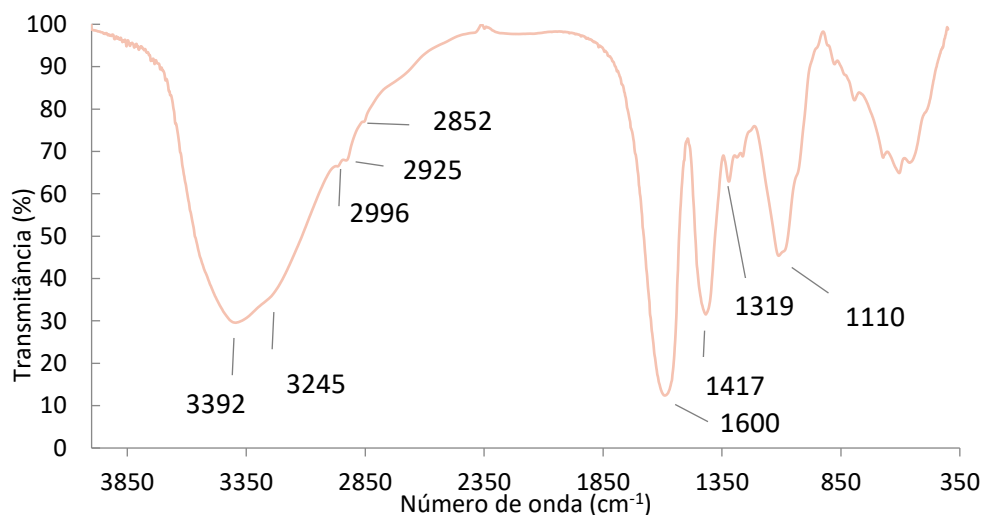


Figura 56: Espectro de FTIR para a mucilagem presente nas folhas de *Actinidia deliciosa*.

Tabela 8: Atribuição das bandas adquiridas do espectro de FTIR da mucilagem das folhas de *Actinidia deliciosa*.

Número de onda (cm ⁻¹)	Intervalo de absorção (cm ⁻¹)	Tipo de ligação	Referência
3392	3447,91 – 3354,35	Grupos CO e OH	[161]
3245	3245	Grupos hidroxilo intra- e inter-molecular que compõem a estrutura polimérica dos hidratos de carbono	[54]
2996	2400-3200	Ligação N–H (iões amónio)	[5]
2925	2925	Ligação C–H (alquilo e metilo)	[5]
2852	2885,63 – 2811,37	Estiramento C-H do grupo alquilo, estiramento C=O e O-H dos ácidos carboxilos e estiramento da ligação C-H dos grupos metileno (-CH ₂ -)	[161], [162]
1600	1618 - 1430	Banca típica de grupos carboxilato dos resíduos de ácidos galaturónicos	[161]
1417	1420	Deformação simétrica dos grupos C-H e C-OH de açúcares redutores	[162]
1319	1740-1258	Grupos acetilo	[161]
1110	1200-800	Região de impressão digital dos hidratos de carbono.	[161]
	1249 - 1018	Estiramento C–O	[54]

Da precipitação das mucilagens do extrato, como já foi referido anteriormente, resultam duas frações o sobrenadante e o precipitado. O sobrenadante, rico em compostos fenólicos e com atividades biológicas interessantes, poderá ser utilizado pela indústria alimentar/farmacêutica como uma fonte de compostos bioativos. No entanto, também as mucilagens resultantes do processo de purificação poderão vir a ser aproveitadas, para formulações farmacêuticas como excipientes. O uso das mucilagens para indústria farmacêutica tem vindo a ganhar grande destaque, uma vez que são produtos naturais e como tal, são baratos, biocompatíveis, biodegradáveis, amigas do ambiente e não apresentam efeitos secundários, mostrando ser uma via alternativa à utilização de polímeros sintéticos que apresentam algumas desvantagens entre elas, o elevado custo, efeitos secundários, toxicidade e não são biodegradáveis [5].

4.4 Identificação de Compostos Bioativos Presentes na Decocção de *Actinidia deliciosa* por HPLC-DAD e LC-MSⁿ

A decocção de *Actinidia deliciosa* foi analisada por HPLC-DAD e LC-MS com vista à identificação dos compostos bioativos, que pudessem justificar a sua atividade biológica. No cromatograma do extrato (de abril de 2014), verifica-se a existência de nove compostos, após

a zona do sinal de injeção (tempo de retenção entre 1-2 min), cuja numeração está indicada na Figura 42a. A análise obtida por LC-MS foi igual para os cinco extratos de *Actinidia deliciosa*, tendo sido identificados um total de nove compostos. Dois deles, o pico 7 e 8, foram inequivocamente identificados por comparação, de tempos de retenção, espectros de UV-Vis e de massa (MS e MS²), com os padrões de referência. As identificações dos restantes sete compostos foram atribuídos com base nos dados da literatura, devido à falta de padrões disponíveis. A tentativa de identificação dos compostos é discutida em baixo.

Na Tabela 9, estão resumidas informações adquiridas para cada um dos picos assinalados anteriormente (Figura 42a), durante a análise LC-ESI-MSⁿ: (1) tempos de retenção, (2) UV-Vis (λ_{\max}), (3) valores de m/z para a molécula desprotonada $[M-H]^-$, (4) iões fragmento MS/MS, (5) identificação.

Tabela 9: Identificação de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de folhas de *Actinidia deliciosa*.

Pico	t_R (min)	λ_{\max} (nm)	Molécula desprotonada $[M-H]^-$	MS/MS iões fragmento (Rel.Ab. %)	Identificação
1	3,33	258	191	173 (100), 111 (12), 155 (4), 85 (2)	Ácido quinico
2	5,55	257, 296	577	407 (100), 451 (69), 425 (42), 289 (26), 559 (16), 245 (5), 287 (4)	Proantocianidina B
3	6,29	286, 324	865	695 (100), 577 (46), 451 (36), 407 (34), 713 (30), 739 (29), 575 (22), 425 (18), 289 (6), 287 (4), 245 (2)	Proantocianidina C
4	8,85	288, 325	771	609 (100), 301 (9), 463 (2)	Quercetina-3-O- rutinosídeo-7-O- glucósido
5	9,28	260, 340	609	447 (100), 463 (64), 301 (60), 179 (2), 271 (1)	Quercetina-3-O- ramnósídeo-7-O- glucósido
6	12,67	268,348	463	316 (100), 317 (22), 179 (4), 271 (2), 287 (1), 151 (1)	Miricitrina
7	13,3	258, 360	609	301 (100), 271 (10), 179 (6), 255 (5)	Rutina
8	14,6	258, 352	447	301 (100), 151 (3), 179 (2), 271 (2), 255 (1)	Quercitrina
9	16,11	223, 263, 346	711 ^a	665 (18), 503 (100)	Ácido triterpénico-O- hexosídeo

As estruturas dos compostos identificados na Tabela 9 foram propostas com base no espectro de UV, bem como no padrão de fragmentação obtida por LC-MS, LC-MS/MS e em alguns casos por LC-MS/MS/MS. Para facilitar a interpretação dos espectros de massa, é necessário conhecer *à priori* alguns padrões de fragmentação dos compostos fenólicos. Por exemplo, a perda de 162 Dalton é indicativa da presença de hexose (glucose ou galactose, os açúcares mais comuns encontrados em flavonoides), a perda de 146 Dalton pode ser resultado de uma perda de raminose, a perda de 133 Daltons aponta para a presença de pentoses (xilose ou arabinose, as pentoses mais comuns encontrados em produtos naturais), e a perda de 308 Dalton aponta para a presença de compostos que possuem uma estrutura dissacarídica do tipo rutinósido ou neohesperidósido ligado por uma ligação -O-glicosídica ^[163].

Os espectros de LC-MS e LC-MS/MS (e em alguns casos LC-MS/MS/MS) de cada um dos picos identificados no cromatograma (Figura 42a), estão representados nas Figuras 57-58; 60-61; 63-64; 66-68; 70-71; 73-74; 76-77; 79-80; 82-84, respetivamente.

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 3,33 minutos, pico 1, é apresentado a seguir (Figura 57).

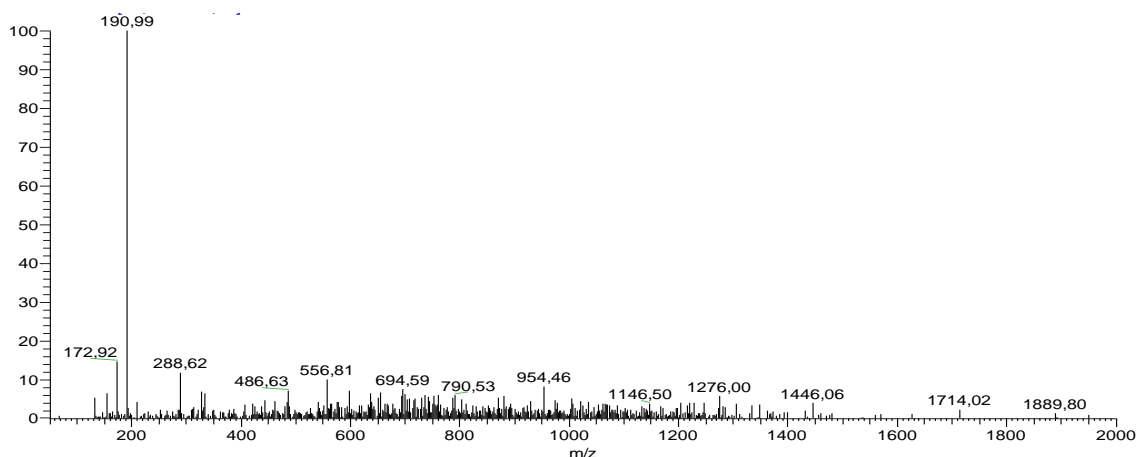


Figura 57: Espectro LC-MS do pico 1 (tr: 3,33 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 1 foi identificado como sendo o ácido quinico. Analisando o espectro de LC-MS do pico 1 (Figura 57), como seria de esperar consegue-se observar o ião $[M-H]^-$ correspondente à molécula desprotonada a m/z 191. Contudo, também se verificaram iões fragmento, como o ião m/z 173 que resulta da perda de 18Da, correspondente a uma molécula de água $[M-H-H_2O]^-$ ^[164].

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada a m/z 191 é representado na Figura 58.

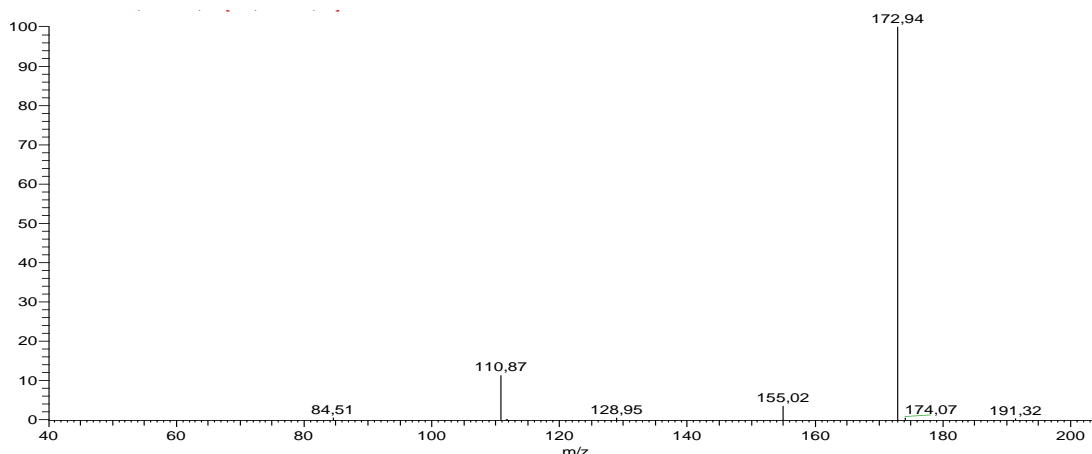


Figura 58: Espectro LC-MS/MS do pico 1 (tr: 3,33 minutos).

No espectro LC-MS/MS do ião m/z 191, correspondente à molécula desprotonada, podemos analisar os fragmentos resultantes da sua fragmentação (Tabela 9, Figura 58, Figura 59). Da fragmentação ião m/z 191 obtém-se o ião fragmento m/z 173, pico base, que resulta da perda de 18Da, correspondente a uma molécula de água $[M-H-H_2O]^-$. No espectro também é possível constatar a presença de dois iões fragmentos resultantes do ião m/z 173 ^[164]. O ião m/z 155 resulta da perda de 18 Da, que corresponde a uma molécula de H_2O $[M-H-2H_2O]^-$, e o ião m/z 111 resulta da perda de 62 Da, correspondente a H_2CO_3 $[M-H-CH_2O_3-H_2O]^-$.

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espectros de LC-MS e LC-MS/MS do ácido quinico, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 59):

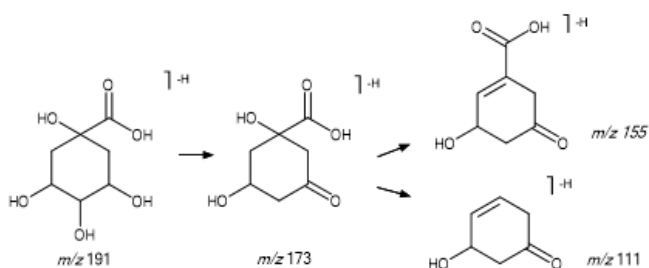


Figura 59: Via de fragmentação para a molécula de ácido quinico.

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 5,55 minutos, pico 2, é apresentado a seguir na Figura 60.

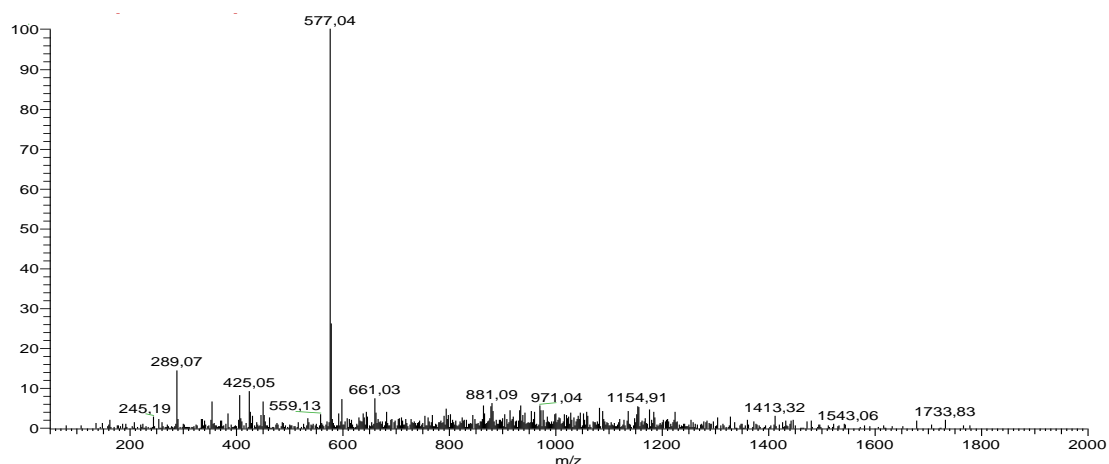


Figura 60: Espectro LC-MS do pico 2 (tr: 5,55 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 2 foi identificado como sendo a proantocinidina B. Analisando o espectro de LC-MS da proantocinidina B (Figura 60), consegue-se observar o ião $[M-H]^-$ correspondente à molécula desprotonada a m/z 577 [165], [166]. No entanto também se verifica a presença do dímero da proantocianidina B a m/z 1155 $[2M-H]^-$.

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada a m/z 577 está representado na Figura 61.

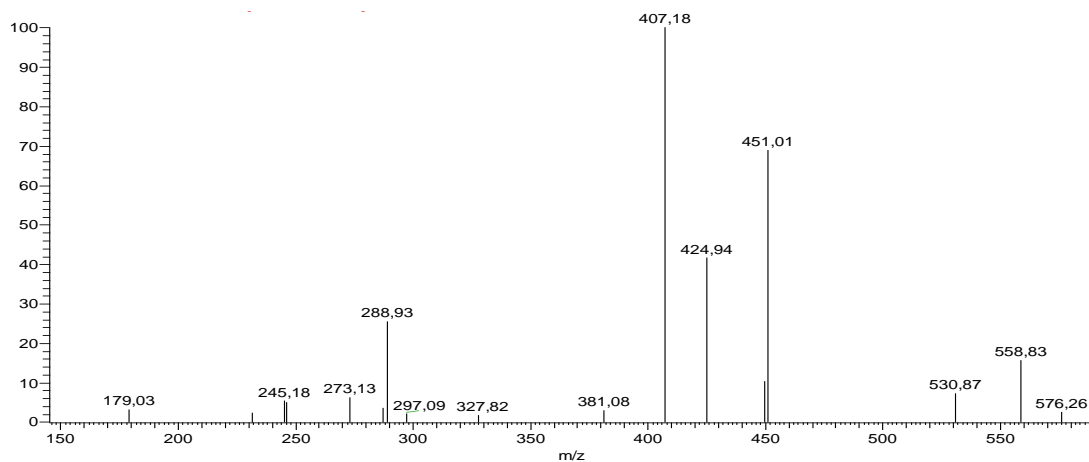


Figura 61: Espectro LC-MS/MS do pico 2 (tr: 5,55 minutos).

No espectro LC-MS/MS do ião m/z 577, correspondente à molécula desprotonada da proantocianidina B, podemos analisar os iões fragmento resultantes da sua fragmentação (Tabela 9, Figura 61, Figura 62). Da fragmentação do ião m/z 577 resultam cinco iões fragmento, sendo eles, os iões m/z 559, m/z 425, m/z 451, m/z 289, e m/z 287. A fragmentação das proantocianidinas do tipo B e C rege-se fundamentalmente pela ocorrência de fissão *retro* Diels-Alder (RDA), fissão do anel heterocíclico (HRF) e clivagem da ligação interflavânica pelo mecanismo de “*quinone methide*” [165], [166].

O íão m/z 559 resulta da perda de 18Da, correspondente a uma molécula de água $[M-H-H_2O]^-$, o íão m/z 425 resulta de uma fissão *retro* Diels-Alder (RDA), entre as posições O-C₂ e C₃-C₄ o mecanismo subjacente a esta fissão compreende a clivagem do anel heterocíclico (anel C), resultando na perda de 152Da $[M-H-C_8H_8O_3]^-$, o íão m/z 451 resulta da fissão do anel heterocíclico (HRF), entre as posições O-C₂ e C₄-C₅, com consequente perda do anel A, conduzindo à perda de 126Da $[M-H-C_6H_6O_3]^-$, e os íões m/z 289 $[M-H-C_{15}H_{12}O_6]^-$ e m/z 287 $[M-H-C_{15}H_{14}O_6]^-$ resultam da clivagem da ligação interflavânica (C₄-C₈) pelo mecanismo de “*quinone methide*” ^{[165], [166]}. O íão m/z 407, pico base, resulta da fissão de *retro* Diels-Alder (RDA), com subsequente estabilização por perda de uma molécula de água $[M-H-C_8H_8O_3-H_2O]^-$, à semelhança do que tem sido referido em proantocianidinas. Estes resultados sugerem que, nas condições utilizadas, a fragmentação mais suscetível de ocorrer nos dímeros é a fissão *retro* Diels-Alder. No espectro também é possível constatar a presença do íão m/z 245, resultante da perda de C₂H₄O (-44Da) $[M-H-C_{15}H_{12}O_6-C_2H_4O]^-$ do íão fragmento m/z 289.

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espectros de LC-MS e LC-MS/MS da proantocianidina B, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 62):

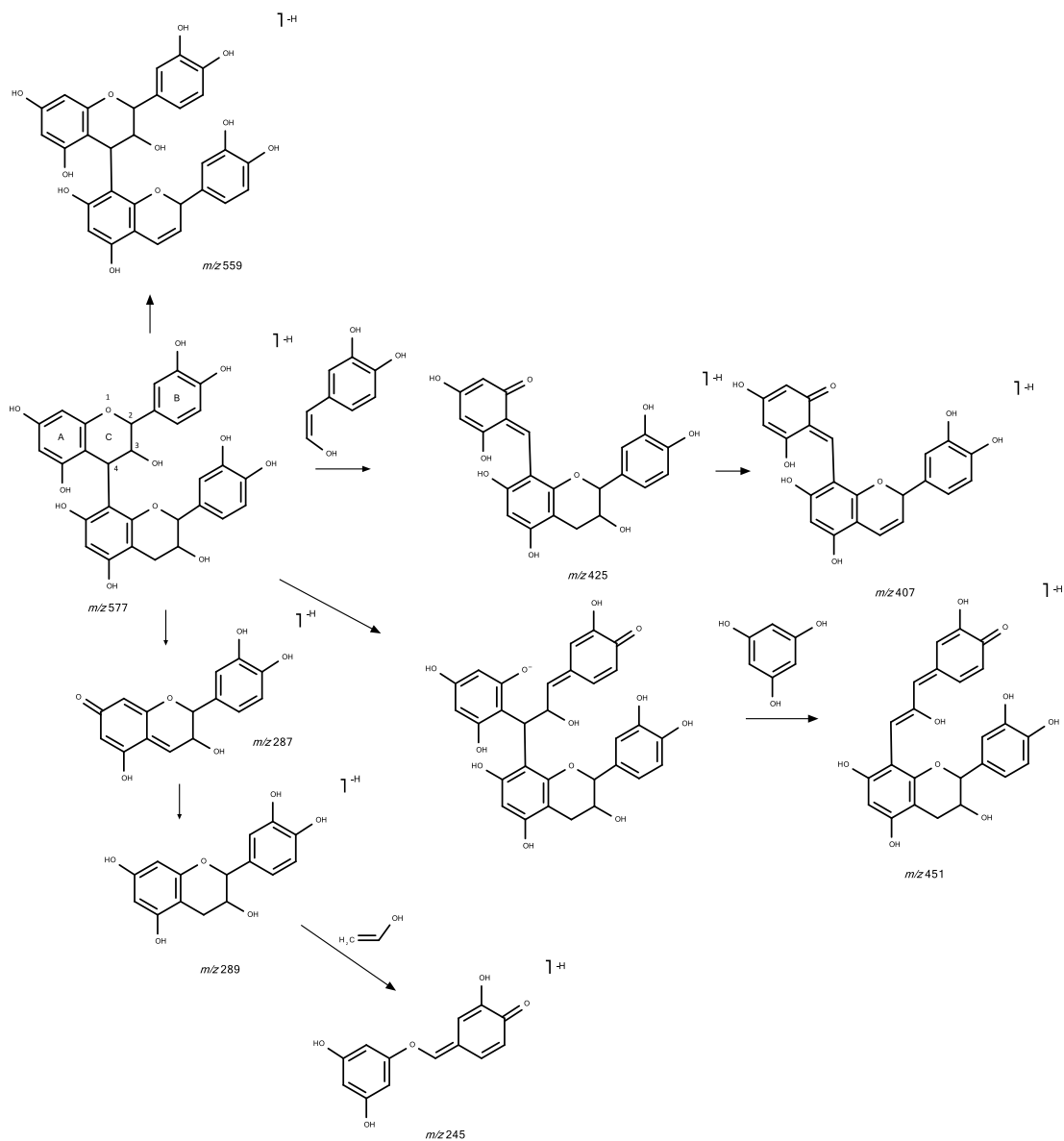


Figura 62: Via de fragmentação da proantocianidina B - adaptado [165], [166].

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 6,29 minutos, pico 3, é apresentado a seguir (Figura 63).

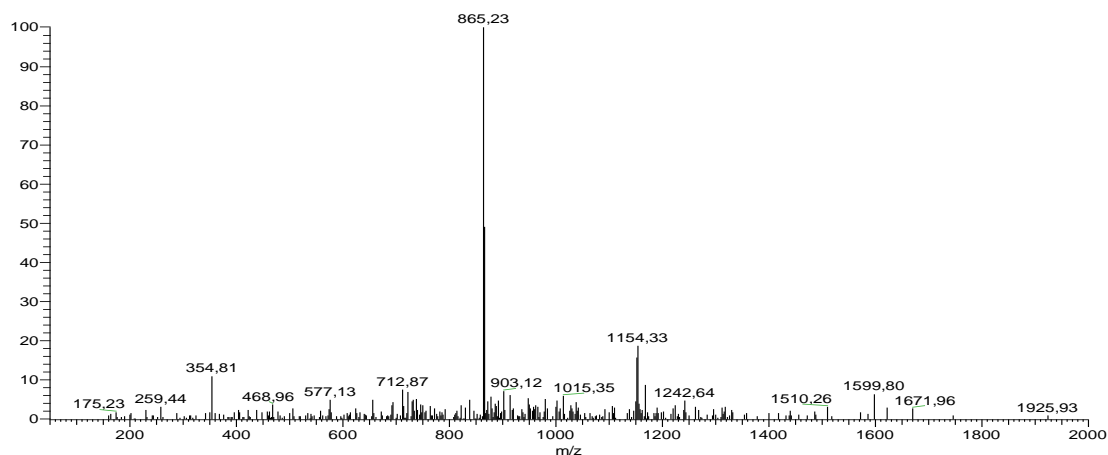


Figura 63: Espectro LC-MS do pico 3 (tr: 6,29 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 3 foi identificado como sendo a proantocinidina C. Analisando o espectro de LC-MS da proantocinidina C (Figura 63), consegue-se observar o ião $[M-H]^-$ correspondente à molécula desprotonada a m/z 865.

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada a m/z 865 está representado na Figura 64.

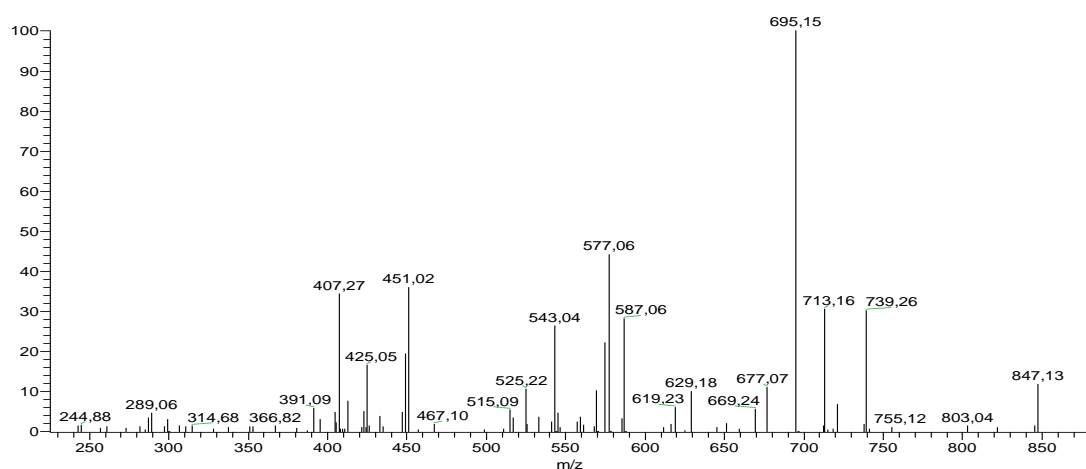


Figura 64: Espectro LC-MS/MS do pico 3 (tr: 6,29 minutos).

No espectro LC-MS/MS do ião m/z 865, correspondente à molécula desprotonada da proantocianidina C, podemos analisar os iões fragmento resultantes da sua fragmentação (Tabela 9, Figura 64, Figura 65). Da fragmentação do ião m/z 865 resultam oito iões fragmento, sendo eles, os iões m/z 847, m/z 739, m/z 713, m/z 695, m/z 577, m/z 575, m/z 289, e m/z 287.

O ião m/z 847 resulta da perda de 18Da, correspondente a uma molécula de água $[M-H-H_2O]^-$, o ião m/z 713 resulta de uma fissão *retro* Diels-Alder (RDA), e tal como referido

anteriormente este mecanismo leva à perda de 152Da $[M-H-C_8H_8O_3]^-$, o ião m/z 739 resulta da fissão do anel heterocíclico (HRF), com consequente perda do anel A, conduzindo à perda de 126Da $[M-H-C_6H_6O_3]^-$ ^{[165], [166]}. Da clivagem da ligação interflavânica, da molécula desprotonada a m/z 865, pelo mecanismo de “*quinone methide*” resultam quatro iões fragmentos, sendo eles, os iões m/z 287, m/z 289, m/z 575 e m/z 577 ^{[165], [166]}. No caso dos iões fragmento m/z 289 $[M-H-C_{30}H_{24}O_{12}]^-$ e m/z 575 $[M-H-C_{15}H_{14}O_6]^-$ a clivagem da ligação interflavânica dá-se entre a unidade superior e intermédia da proantocianidina C desprotonada, contrariamente nos iões fragmento m/z 287 $[M-H-C_{30}H_{26}O_{12}]^-$ e m/z 577 $[M-H-C_{15}H_{12}O_6]^-$ a clivagem da ligação dá-se entre a intermédia e inferior. O ião m/z 695, pico base, resulta da fissão de *retro* Diels-Alder (RDA), com subsequente estabilização por perda de uma molécula de água. Estes resultados sugerem tal como se verificou no caso da proantocianidina B que, nas condições utilizadas, a fragmentação mais suscetível de ocorrer nos trímeros é a fissão *retro* Diels-Alder ^{[165], [166]}.

No entanto no espetro também é possível constatar a presença de iões relativos à fragmentação dos iões fragmento da molécula de proantocianidina B desprotonada, como os iões m/z 451, m/z 425, m/z 407 e m/z 245. A explicação do mecanismo destas fragmentações encontra-se explicado anteriormente na análise da proantocianidina B (pico 2).

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espetros de LC-MS e LC-MS/MS da proantocianidina C, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 65):

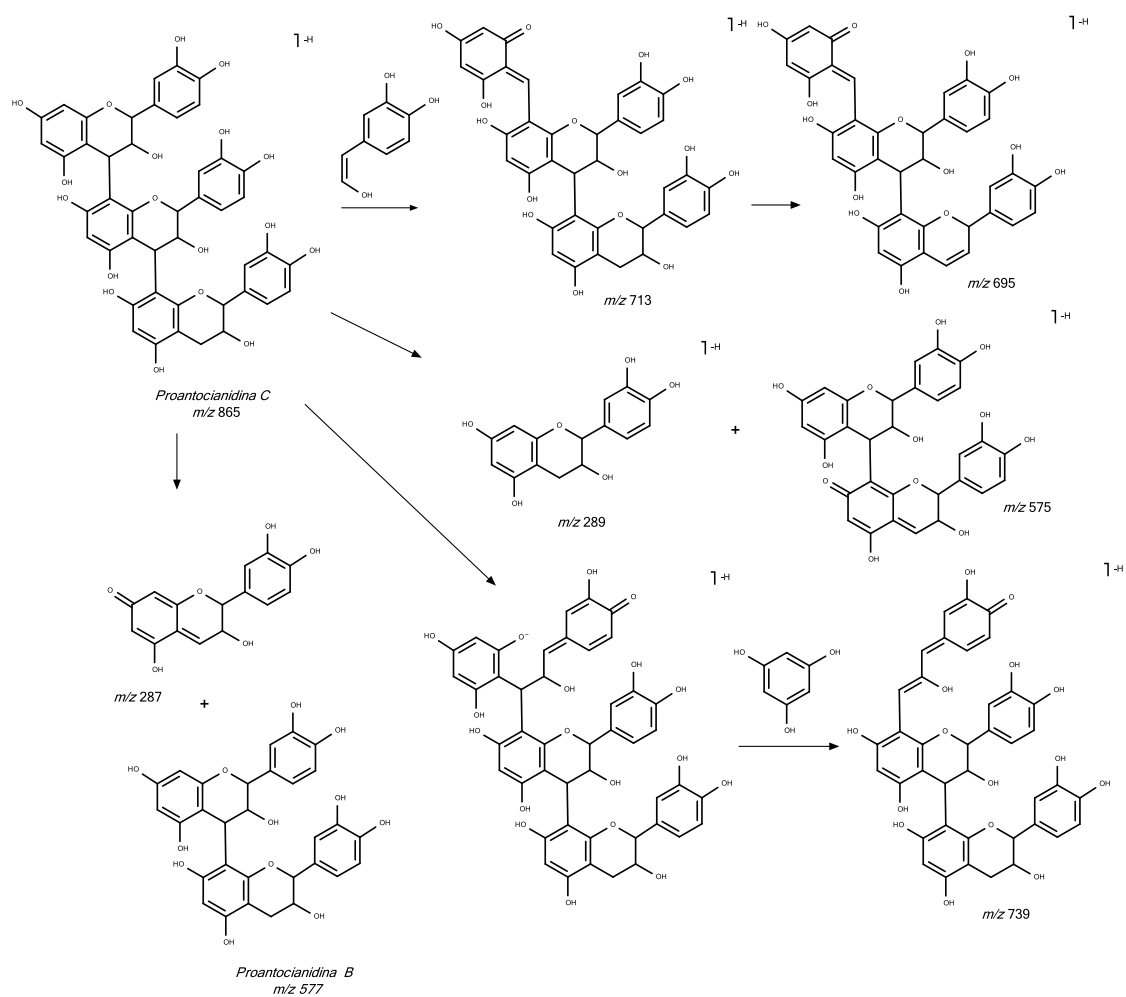


Figura 65: Via de fragmentação da proantocianidina C – adaptado [165], [166].

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 8,85 minutos, pico 4, é apresentado a seguir na Figura 66.

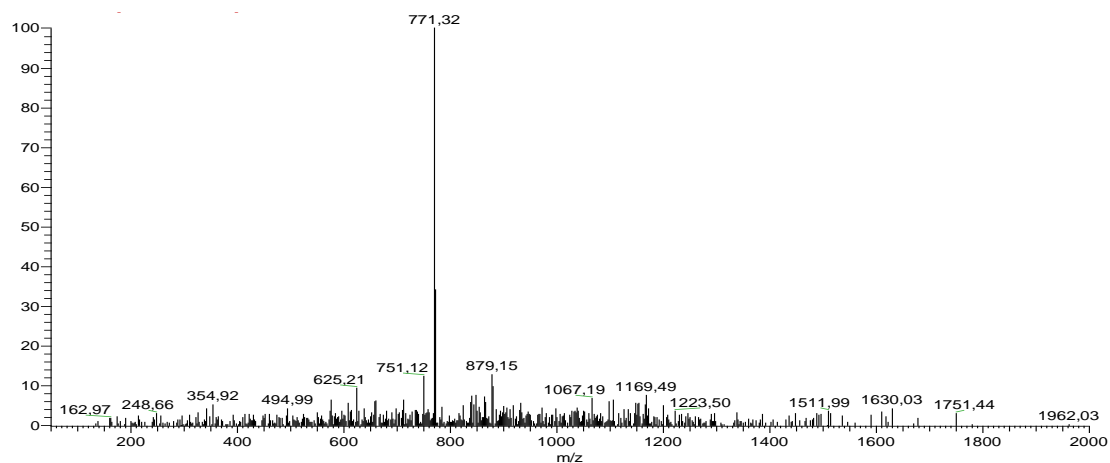


Figura 66: Espectro LC-MS do pico 4 (tr: 8,85 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 4 foi identificado como quercetina-3-*O*-rutinósido-7-*O*-glucósido. No espectro LC-MS da quercetina-3-*O*-rutinósido-7-*O*-glucósido, consegue-se observar o ião $[M-H]^-$ correspondente à molécula desprotonada m/z 771 (Figura 66) ^[163].

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada m/z 771 está representado na Figura 67.

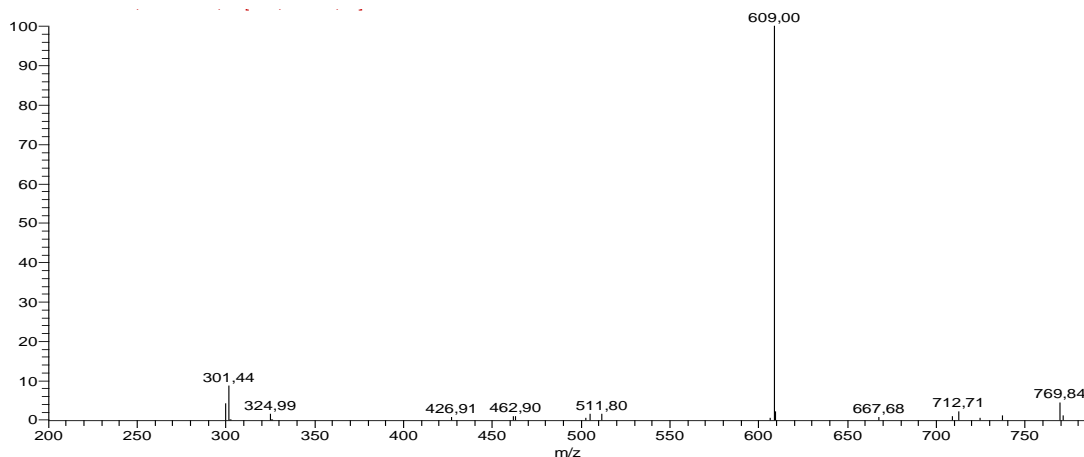


Figura 67: Espectro LC-MS/MS do pico 4 (tr: 8,85 minutos).

No espectro LC-MS/MS do ião m/z 771, podemos analisar os iões fragmento resultantes da fragmentação da molécula de quercetina-3-*O*-rutinósido-7-*O*-glucósido desprotonada (Tabela 9, Figura 67). Da fragmentação do ião m/z 771 resulta um ião fragmento de m/z 609 ^[163]. O ião m/z 609, pico base, resulta da perda de uma glucose (-162Da) na posição sete da quercetina $[M-H-Glucose]^-$. No entanto no espectro também é possível constatar a existência de dois iões fragmento m/z 463 e m/z 301 resultantes da fragmentação do ião m/z 609 ^[163]. O ião m/z 463 resulta da perda da ramnose (-146Da) $[M-H-Glucose-Ramnose]^-$, e o ião m/z 301 resulta da perda do rutinósido (glucose + ramnose) do flavonoide (-308Da) $[M-H-2Glucose-Ramnose]^-$.

Para além da análise LC-MS e LC-MS/MS foi também analisado o espectro LC-MS/MS/MS (Figura 68) do composto 4, de modo a confirmar que este composto corresponderia realmente a uma molécula de quercetina glicosilada. Os iões característicos da aglicona (m/z 301), correspondendo eles, aos picos a m/z 255, m/z 271, m/z 179 e a m/z 151 ^[167], ^[168], a aparecerem neste espectro serão de baixa intensidade, uma vez que resultam da fragmentação do ião m/z 301 e não do ião m/z 609, mas são cruciais para corroborar a hipótese apresentada de que o composto 4 é a quercetina-3-*O*-rutinósido-7-*O*-glucósido ^[163], ^[167].

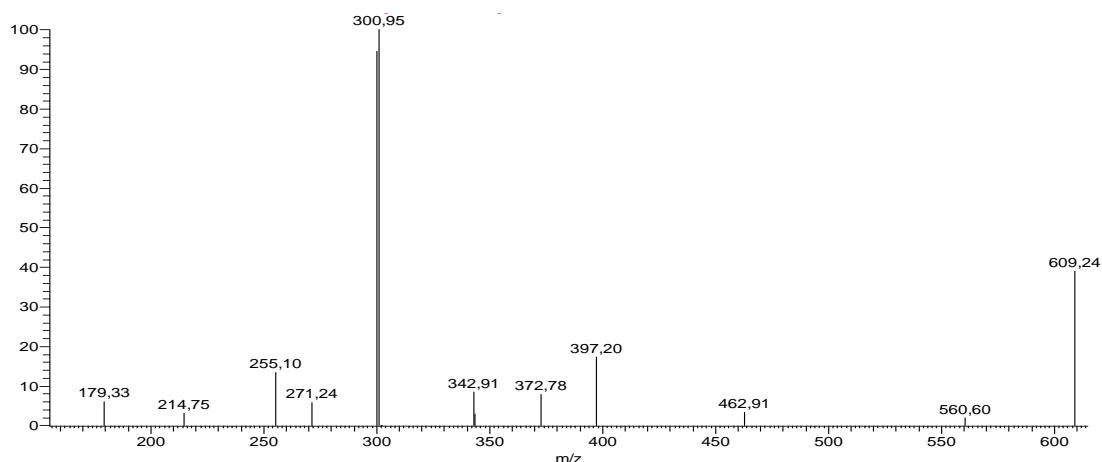


Figura 68: Espectro LC-MS/MS/MS do pico 4 (tr: 8,85 minutos).

Analisando o espectro LC-MS/MS/MS do ião m/z 609 é possível observar a existência de iões fragmento, m/z 463 e m/z 301, com o mecanismo de fragmentação explicado anteriormente na análise LC-MS/MS. Ainda assim no espectro (Figura 68) verifica-se a existência de picos característicos da fragmentação da quercitrina (m/z 301), como o ião m/z 271, m/z 255, e m/z 179. O ião m/z 271 resulta da perda de 30Da, correspondente a $\text{CH}_2\text{O}[\text{M-H-2Glucose-Ramnose-CH}_2\text{O}]^-$, o ião m/z 255 resulta da perda de 46Da, correspondente a $\text{CH}_2\text{O}_2[\text{M-H-2Glucose-Ramnose-CH}_2\text{O}_2]^-$ e o ião m/z 179 ($^{1,2}\text{A}^-$) resulta de uma fissão de *retro* Diels-Alder (RDA), entre as posições O-C₂ e C₂-C₃, o mecanismo subjacente a esta fissão compreende a clivagem do anel heterocíclico (anel C) $[\text{M-H-2Glucose-Ramnose-C}_7\text{H}_6\text{O}_2]^-$.

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espectros de LC-MS, LC-MS/MS e LC-MS/MS/MS da quercetina-3-*O*-rutinosido-7-*O*-glucósido, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 69):

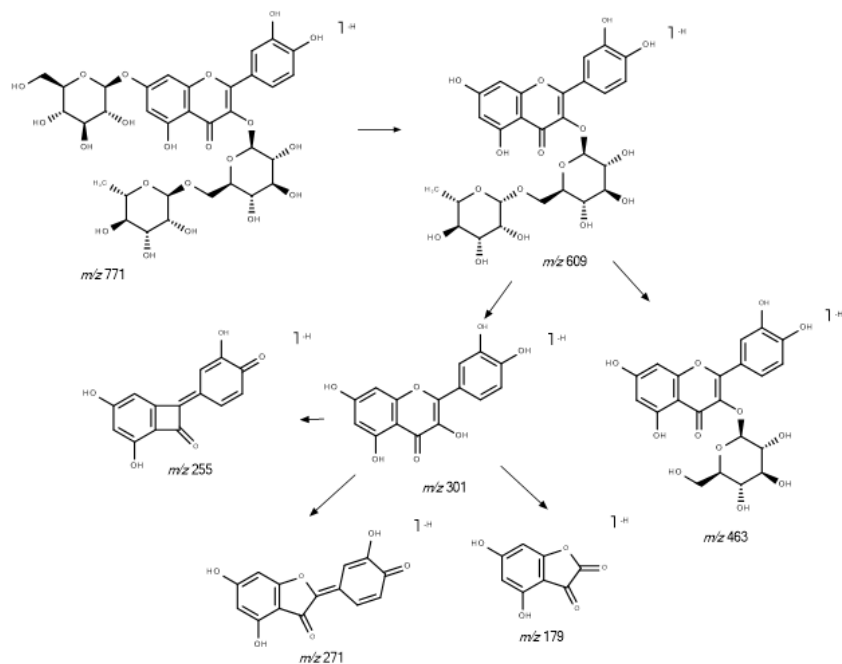


Figura 69: Via de fragmentação da quercetina-3-O-rutinósido-7-O-glucósido.

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 9,28 minutos, pico 5, é apresentado a seguir na Figura 70.

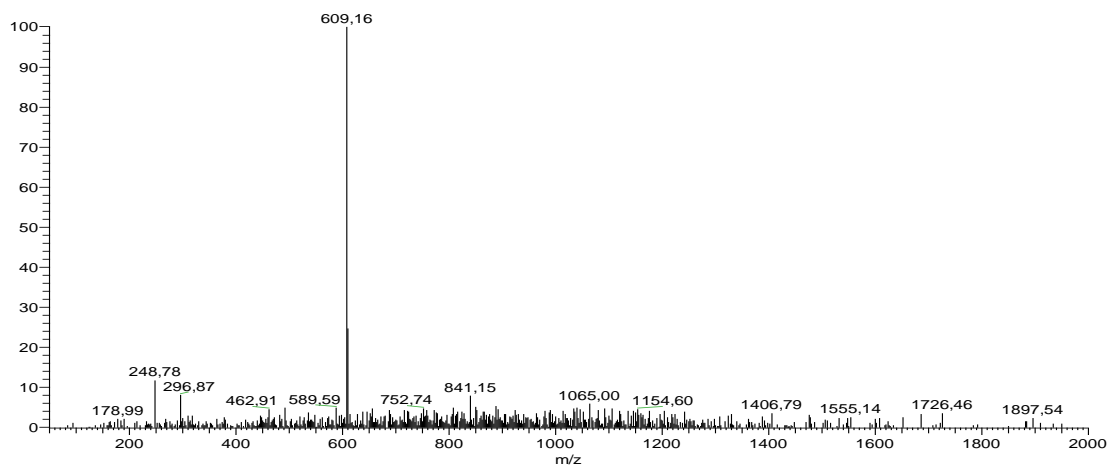


Figura 70: Espectro LC-MS do pico 5 (tr: 9,28 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 5 foi identificado como sendo a quercetina-3-O-ramnósido-7-O-glucósido. No espectro LC-MS da quercetina-3-O-ramnósido-7-O-glucósido, consegue-se observar o íon [M-H]⁻ correspondente à molécula desprotonada a m/z 609 (Figura 70) [169].

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada a m/z 609 está representado na Figura 71.

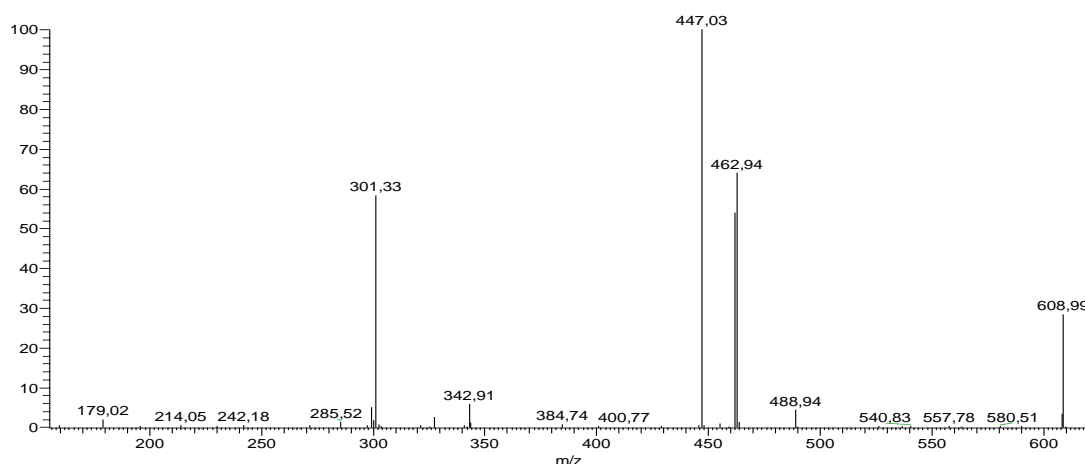


Figura 71: Espectro LC-MS/MS do pico 5 (tr: 9,28 minutos).

Através do espectro LC-MS/MS do íon m/z 609, correspondente à molécula desprotonada, podemos analisar os íons fragmento resultantes da sua fragmentação (Tabela 9, Figura 70). Da fragmentação do íon m/z 609 resultam dois íons fragmento, sendo eles, os íons m/z 447 e m/z 463^[169]. O íon m/z 447, pico base, resulta da perda de 162Da, correspondente a uma molécula de glucose, na posição sete da quercetrina $[M-H-Glucose]^-$, e o íon m/z 463 resulta da perda de 146Da, correspondente a uma molécula de ramnose, na posição três da quercetrina $[M-H-Ramnose]^-$. O íon m/z 301 resulta da perda dos dois açúcares, glucose e ramnose, $[M-H-Glucose-Ramnose]^-$ da molécula desprotonada de quercetina-3-*O*-ramnósido-7-*O*-glucósido. No entanto no espectro de LC-MS/MS, também é possível verificar a presença do íon fragmento m/z 271 $[M-H-Glucose-Ramnose-CH_2O]^-$ e m/z 179 ($^{1,2}A^-$) $[M-H-Glucose-Ramnose-C_7H_6O_2]^-$, os quais como já referido anteriormente (análise do composto 4) são íons característicos da fragmentação da aglicona da quercetina^{[167], [168]}.

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espectros de LC-MS e LC-MS/MS da quercetina-3-*O*-ramnósido-7-*O*-glucósido, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 72):

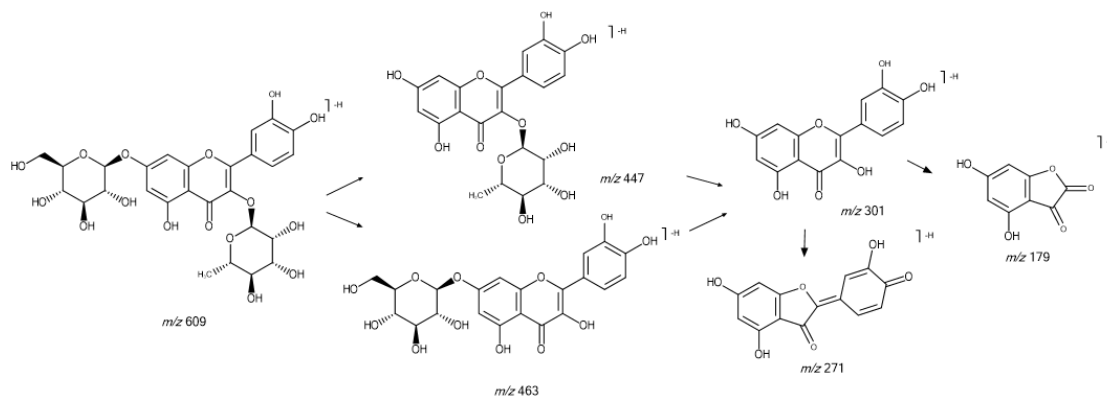


Figura 72: Via de fragmentação da quercetina-3-*O*-ramnósido-7-*O*-glucósido.

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 12,67 minutos, pico 6, é apresentado a seguir na Figura 73.

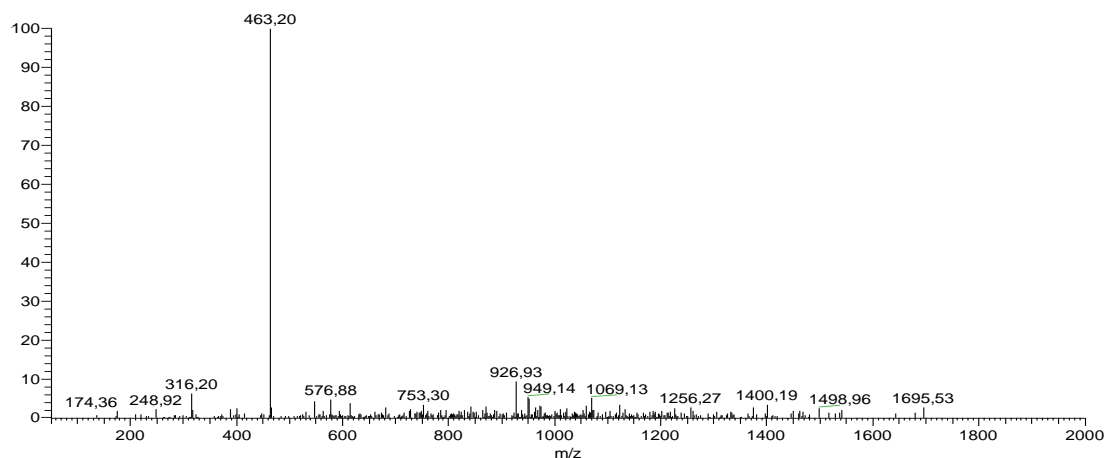


Figura 73: Espectro LC-MS do pico 6 (tr: 12,67 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 6 foi identificado como sendo a miricitrina (mirecetina-3-*O*-ramnósido). Analisando o espectro de LC-MS da miricitrina (Figura 73), como seria de esperar consegue-se observar o ião $[M-H]^-$ correspondente à molécula desprotonada a m/z 463 ^[167]. No entanto também se verifica a presença do dímero da miricitrina a m/z 927 $[2M-H]^-$.

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada a m/z 463 está representado na Figura 73.

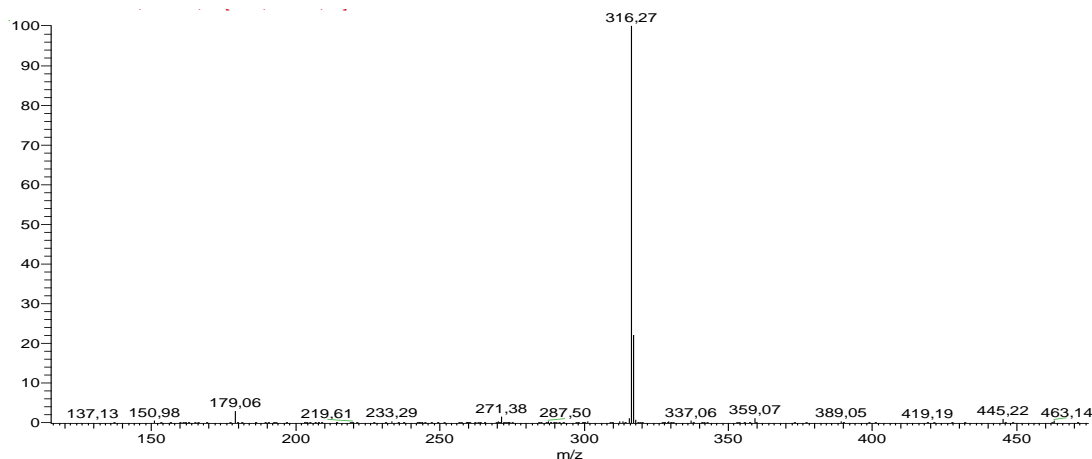


Figura 74: Espectro LC-MS/MS do pico 6 (tr: 12,67 minutos).

No espectro LC-MS/MS do ião m/z 463, podemos analisar os iões fragmento resultantes da fragmentação da molécula de miricitrina desprotonada (Tabela 9, Figura 74). Da fragmentação do ião m/z 463 resultam dois iões fragmento, sendo eles, os iões m/z 317 e a m/z 316 ^[167]. O pico a m/z 316 resulta da perda de 146Da, correspondente a uma molécula de ramnose $[M-H]$.

Ramnose]⁻, e o íão m/z 316, pico base, resulta igualmente da perda de ramnose mas neste caso corresponde a um íão radical da aglicona [M-2H-Ramnose]^{-•}.

No espectro contata-se igualmente a presença de picos característicos da fragmentação da miricetina (m/z 317), como os íões m/z 287, m/z 271, m/z 179, e m/z 151. O íão m/z 287 resulta da perda de 30Da, correspondente a CH_2O [M-H-Ramnose- CH_2O]⁻ e o íão m/z 271 resulta da perda de 46Da, correspondente a CH_2O_2 [M-H-Ramnose- CH_2O_2]⁻. Tanto o íão m/z 179 [M-H-Ramnose- $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$]⁻ como o íão m/z 151 [M-H-Ramnose- $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$]⁻ resultam de uma fissão de *retro* Diels-Alder (RDA) [167], [168]. No entanto as ligações quebradas neste mecanismo diferem entre os dois íões, no íão m/z 179 ($^{1,2}\text{A}^-$) a fissão das ligações dá-se entre as posições O-C₂ e C₂-C₃, e no íão m/z 151 ($^{1,3}\text{A}^-$) entre as posições O-C₂ e C₃-C₄.

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espectros de LC-MS e LC-MS/MS da miricitrina, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 75):

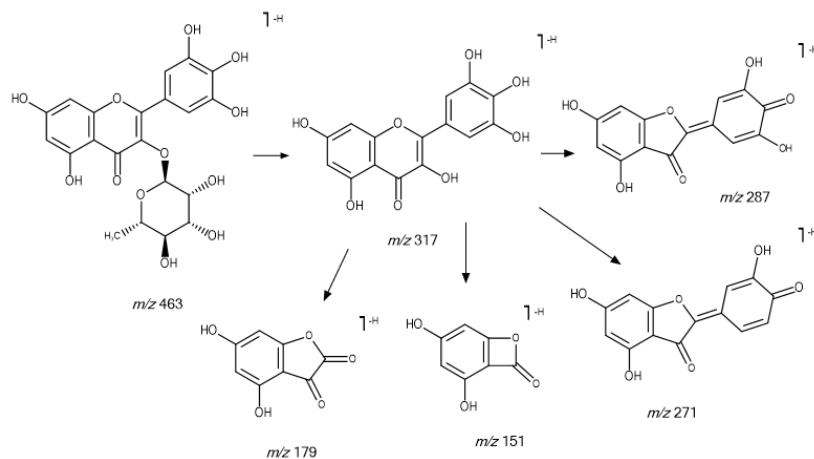


Figura 75: Via de fragmentação da miricitrina.

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 13,3 minutos, pico 7, é apresentado a seguir na Figura 76.

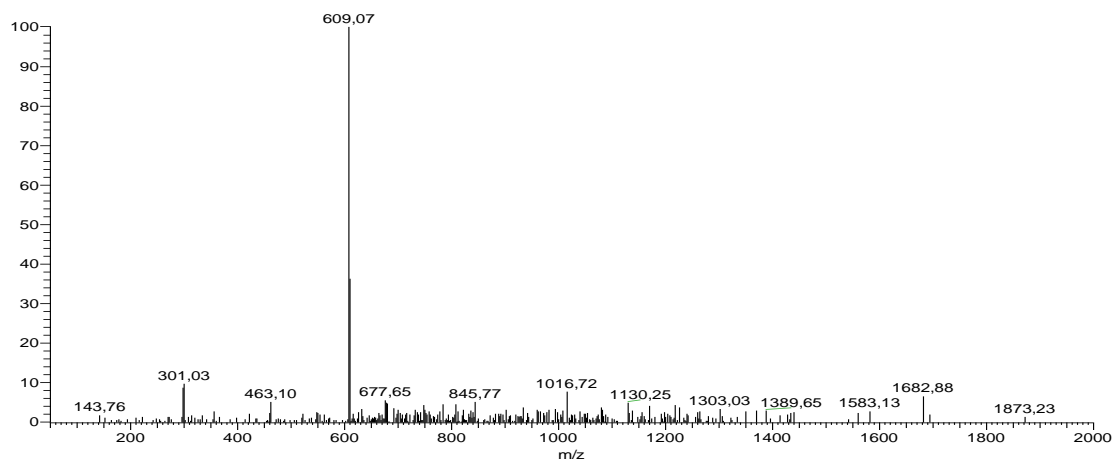


Figura 76: Espectro LC-MS do pico 7 (tr: 13,3 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 7 foi identificado como sendo a rutina. Analisando o espectro de LC-MS da rutina (Figura 76), consegue-se observar o ião $[M-H]^-$ correspondente à molécula desprotonada a m/z 609 ^[163], ^[170]. Contudo, também se verificaram picos correspondentes a iões fragmento, como o ião m/z 301.

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada a m/z 609 está representado na Figura 77.

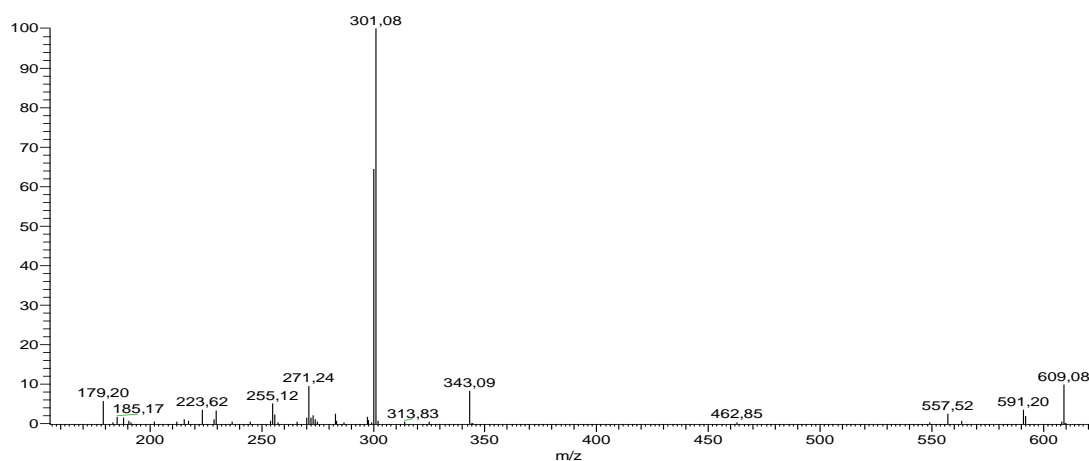


Figura 77: Espectro LC-MS/MS do pico 7 (tr: 13,3 minutos).

No espectro LC-MS/MS do pico a m/z 609, podemos analisar os iões fragmento resultantes da fragmentação da molécula de rutina desprotonada (Tabela 9, Figura 77). Da fragmentação do ião m/z 609 resulta o ião fragmento m/z 301, que resulta da perda de 308Da, correspondente a parte glicosídica da rutina, perda de glucose (162Da) e ramnose (146Da) $[M-H-Glucose-Ramnose]^-$ ^[163], ^[170].

No espectro verifica-se igualmente a presença de picos característicos da fragmentação da quercetina (m/z 301), como os iões m/z 271, m/z 255, e m/z 179 ($^{1,2}A^-$) [167], [168]. O ião m/z 255 resulta da perda de 46Da, correspondente a CH_2O_2 [$M-H-Ramnose-CH_2O_2$] $^-$. O mecanismo das fragmentações dos iões fragmento m/z 271 e m/z 179, encontra-se explicado anteriormente na análise da quercetina-3-*O*-ramnósido-7-*O*-glucósido (pico 5).

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espectros de LC-MS e LC-MS/MS da rutina, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 78):

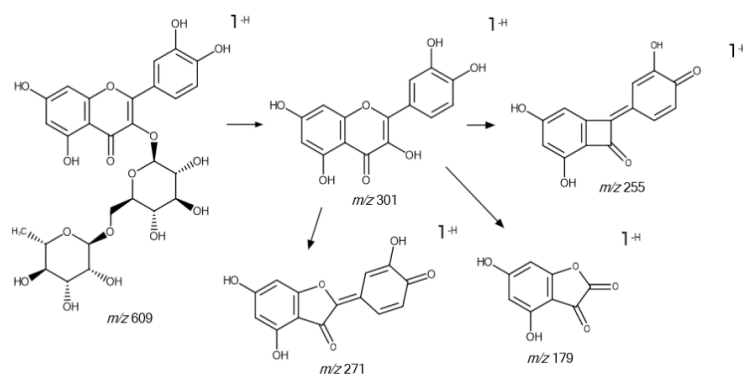


Figura 78: Via de fragmentação da rutina.

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 14,6 minutos, pico 8, é apresentado a seguir na Figura 79.

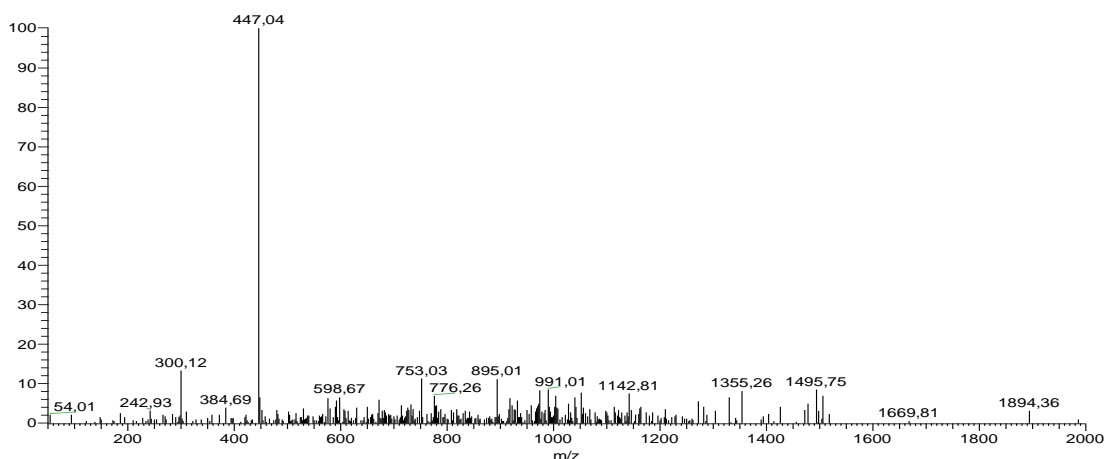


Figura 79: Espectro LC-MS do pico 8 (tr: 14,6 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 8 foi identificado como sendo a quercitrina (quercetina-3-*O*-ramnósido). Analisando o espectro de LC-MS da quercitrina (Figura 79), como seria de esperar consegue-se observar o ião [$M-H$] $^-$ correspondente à molécula desprotonada a m/z 447 [167], [169], [170]. No entanto também se

verifica a presença do dímero da quercitrina a m/z 895 $[2M-H]^-$ e picos correspondentes a iões fragmento, como o ião m/z 301.

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada a m/z 447 está representado na figura 80.

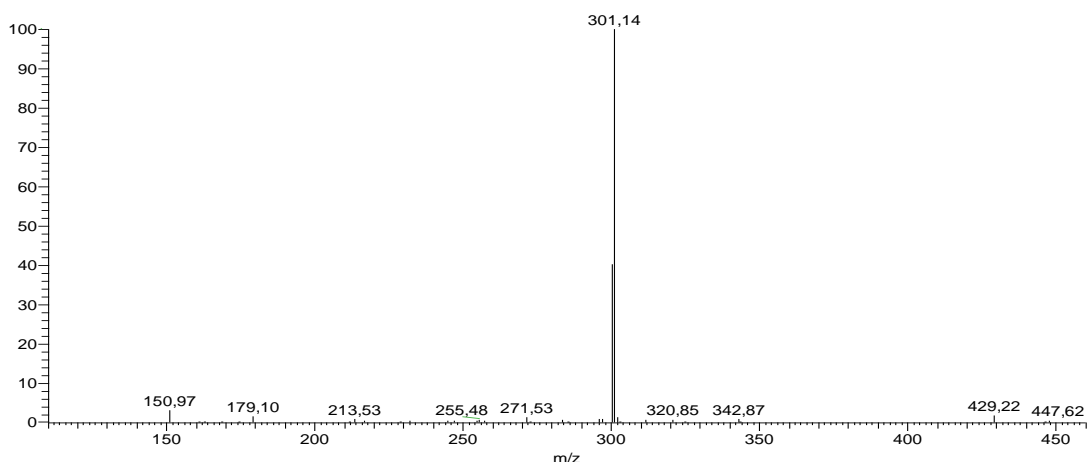


Figura 80: Espectro LC-MS/MS do pico 8 (tr: 14,6 minutos).

Através do espectro LC-MS/MS do ião m/z 447, correspondente à molécula de quercitrina desprotonada, podemos analisar os iões fragmento resultante da sua fragmentação (Tabela 9, Figura 80). Da fragmentação do pico a m/z 447 resulta o ião fragmento a m/z 301 que resulta da perda de 146 Da, que corresponde a uma molécula de ramnose $[M-H-Ramnose]^-$.

No espectro consegue-se verificar igualmente a presença de iões característicos da fragmentação da quercetina (m/z 301), como os iões m/z 271, m/z 255, m/z 179, e m/z 151. O pico a m/z 151 ($^{1,3}A^-$) resulta de uma fissão *retro* Diels-Alder, resultando na perda de 150Da $[M-H-Ramnose-C_8H_6O_3]^-$. A explicação do mecanismo das fragmentações dos iões fragmento a m/z 271, m/z 255, e a m/z 179 ($^{1,2}A^-$) ^{[167], [168]}, encontra-se anteriormente na análise da rutina (pico 7).

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espectros de LC-MS e LC-MS/MS da quercitrina, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 81):

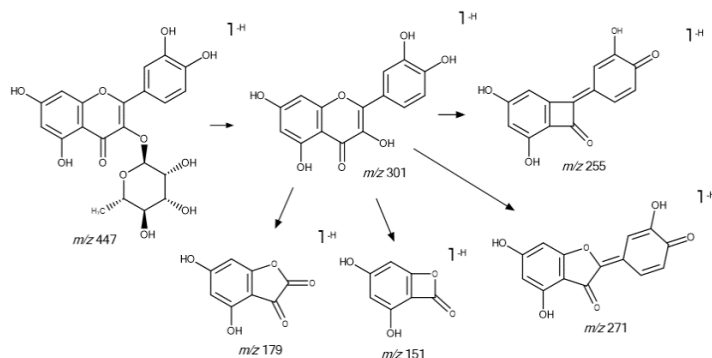


Figura 81: Via de fragmentação da quercitrina.

O espectro LC-MS relativo ao tempo de retenção de 16,11 minutos, pico 9 é apresentado a seguir na Figura 82.

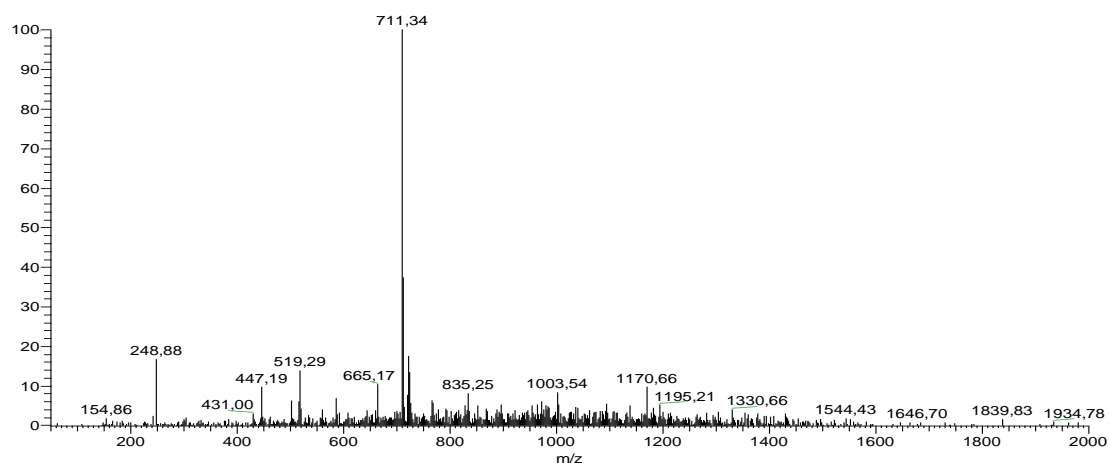


Figura 82: Espectro LC-MS do pico 9 (tr: 16,11 minutos).

De acordo com os dados recolhidos da análise LC-MSⁿ (resumidos na Tabela 9), o composto 9 foi identificado como sendo o ácido triterpénico-*O*-hexósido. Analisando o espectro de LC-MS do ácido triterpénico-*O*-hexósido (Figura 82), é possível constatar-se a presença de um ião aducto com ácido fórmico a m/z 711 [$M+HCOO$]⁻, devido à presença de ácido fórmico (1 %) na fase móvel. No entanto, também é possível verificar a presença da molécula desprotonada do ácido triterpénico-*O*-hexósido a m/z 665 [$M-H$]⁻. Inicialmente a identificação do composto 9 foi de certo modo difícil, uma vez que ao contrário dos oito compostos fenólicos previamente identificados, o composto 9 não aparentava ser um composto fenólico. Como tal foi necessário procurar outros metabolitos presentes em plantas aos quais fosse possível fazer correspondência com os resultados adquiridos. Uma das classes estudadas foram os triterpenóides, verificando-se que o padrão de fragmentação, LC-MS/MS e LC-MS/MS/MS (Figuras 83-84), do ácido triterpénico-*O*-hexósido ^[171] coincidia com os resultados adquiridos experimentalmente. Além disso segundo a literatura o fruto de *Actinidia deliciosa* é composto por uma vasta gama de triterpenóides, uma vez que estão presentes no fruto ^[17], eventualmente também poderão estar presentes na folha de *Actinidia deliciosa*.

O espectro LC-MS/MS da molécula desprotonada a m/z 711 está representado na Figura 83.

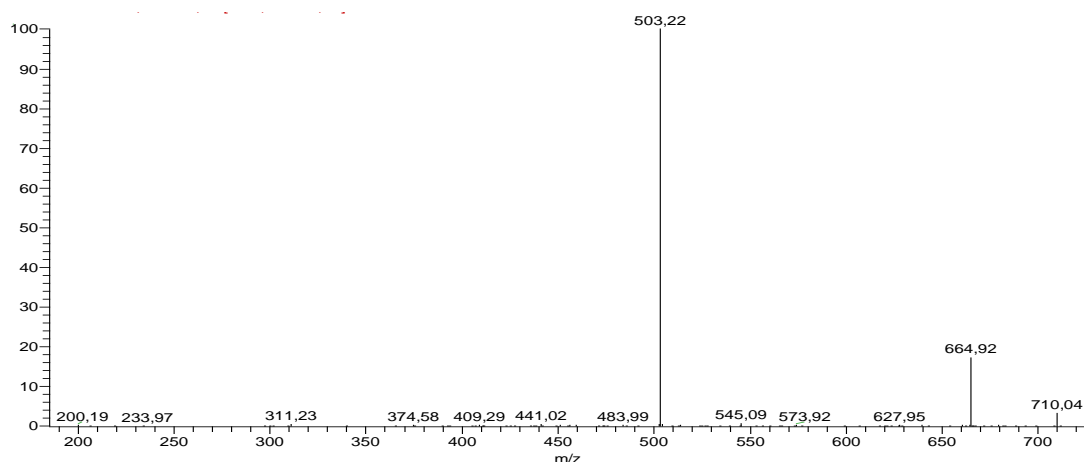


Figura 83: Espectro LC-MS/MS do pico 9 (tr: 16,11 minutos).

No espectro LC-MS/MS, é possível constatar a presença da molécula desprotonada do ácido triterpénico-*O*-hexósido a m/z 665 $[M-H]^-$ e do ião fragmento a m/z 503 resultante da perda de 162Da, correspondente a uma hexose (galactose ou glucose) $[M-H-Hexose]^-$ (Tabela 9, Figura 83).

O espectro LC-MS/MS/MS da molécula desprotonada a m/z 503 está representado na Figura 84.

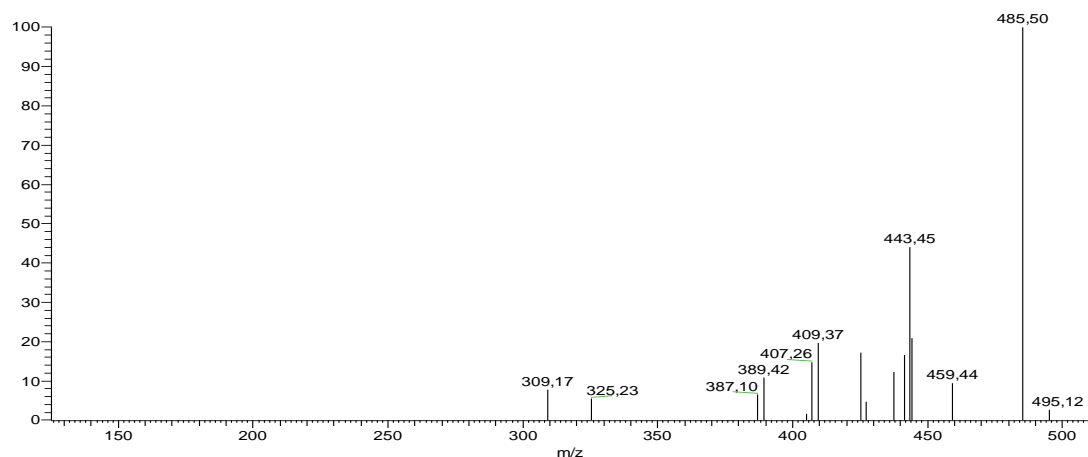


Figura 84: Espectro LC-MS/MS/MS do pico 9 (tr: 16,11 minutos).

Da análise do espectro de LC-MS/MS/MS (Figura 84) do ião fragmento a m/z 503, verifica-se a existência de iões característicos do ácido triterpénico, como o ião m/z 485, m/z 459, m/z 441, m/z 439 e m/z 387 ^[171]. Da fragmentação do ião m/z 503 resultam dois iões fragmento o ião m/z 485 e o pico a m/z 459. O ião m/z 485, pico base, resulta da perda de 18Da, correspondente a uma molécula de água $[M-H-Hexose-H_2O]^-$ e o ião m/z 459 resulta da perda de 44Da, correspondente a uma molécula de dióxido de carbono $[M-H-Hexose-CO_2]^-$.

No entanto também é possível visualizar no espectro iões fragmento resultantes da fragmentação dos iões a m/z 485 e a m/z 459 [171]. O ião a m/z 485 perde 44Da, correspondente a uma molécula de dióxido de carbono, conduzindo à formação do ião a m/z 441[M-H-Hexose-CO₂]⁻. A formação do ião a m/z 439 resulta da perda de 46Da do ião a m/z 485, que corresponde a uma molécula de ácido fórmico [M-H-Hexose-HCOOH]⁻. A perda de 72 Da, correspondente a C₄H₈O, do ião fragmento a m/z 459 origina o ião fragmento a m/z 387 [M-H-Hexose- C₄H₈O]⁻.

As fragmentações referidas anteriormente, na análise dos espectros de LC-MS, LC-MS/MS e LC-MS/MS/MS do ácido triterpénico-*O*-hexósido, podem ser descritas do seguinte modo (Figura 85):

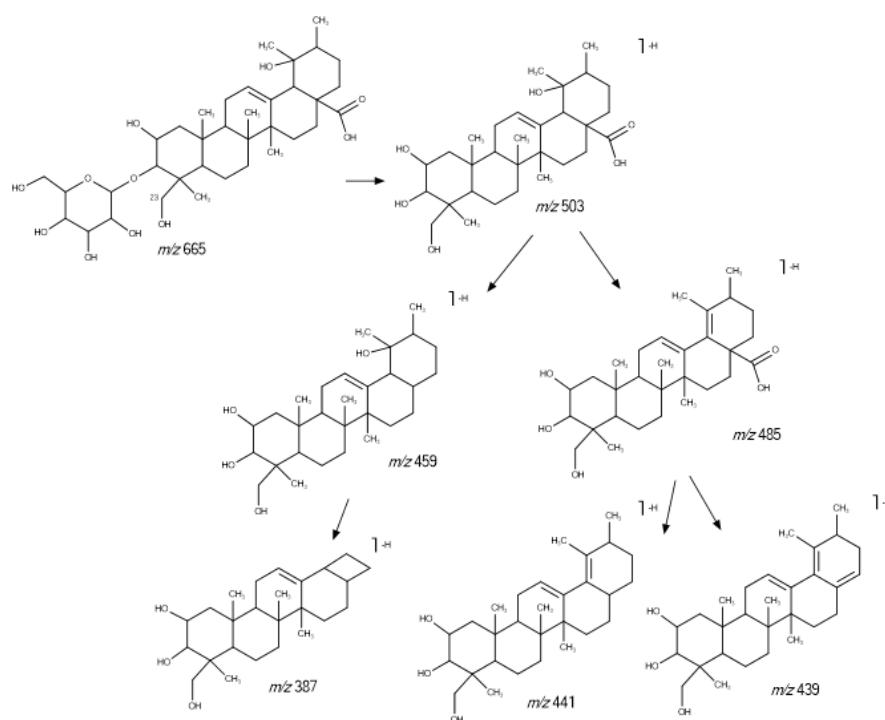


Figura 85: Via de fragmentação do ácido triterpénico-*O*-hexósido – adaptado [171].

4.5 Quantificação de Rutina e Quercitrina

Depois da análise por espectrometria de massa ter confirmado a presença de rutina e quercitrina nos extratos aquosos de *Actinidia deliciosa*, soluções padrão de rutina e quercitrina foram injetadas no HPLC-DAD (de acordo com o ponto 3.9.6). A quantificação de rutina e quercitrina foi feita para os diferentes extratos de *Actinidia deliciosa* e para a fração sobrenadante resultante da precipitação com etanol (Tabela 10). Para cada amostra analisada

foram feitas duas medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

Tabela 10: Conteúdo em rutina e quercitrina de cada extrato, antes (extrato inicial) e após precipitação de etanol (sobrenadante), Valores expressos em μg por mg de extrato.

Extrato	Extrato inicial		Sobrenadante	
	Rutina	Quercitrina	Rutina	Quercitrina
Abril de 2014	$3,2 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,3$
Setembro de 2015	$5,9 \pm 0,6$	$6,7 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,7$	$9,2 \pm 0,4$
Outubro de 2015	$16,9 \pm 0,9$	$7,4 \pm 0,7$	$21,9 \pm 0,8$	$10 \pm 0,5$
Novembro de 2015	$19,4 \pm 0,2$	$12,9 \pm 0,2$	$26 \pm 0,3$	$17,4 \pm 0,4$
Dezembro de 2015	$7,7 \pm 0,9$	$13,9 \pm 0,7$	$10,9 \pm 0,5$	$21,4 \pm 0,8$

De acordo com os dados apresentados na tabela 10, é possível verificar que o amadurecimento da folha bem como a temperatura têm influência no conteúdo de rutina e quercitrina nos diferentes extratos, conduzindo a um aumento destes dois compostos fenólicos ao longo dos meses, com a exceção do extrato de dezembro, no qual a concentração de rutina diminui. Segundo P. Liu, H. Kallio e B. Yang ^[153], a diminuição da temperatura tem um efeito positivo no conteúdo de derivados de quercetina, assim o aumento de rutina e quercitrina ao longo dos meses, com a exceção da rutina em dezembro, pode ser uma resposta à queda da temperatura que se verifica nestes meses.

Nos diferentes sobrenadantes o conteúdo de rutina e quercitrina aumentou. Estes valores estão concordantes com os obtidos no ponto 4.2.2, no qual se verificou que no sobrenadante a quantidade de fenóis totais por miligrama de extrato aumentava, e com isso a sua atividade antioxidante, de acordo com o método do DPPH. No entanto, outros estudos de atividade biológica do sobrenadante serão discutidas ao longo do trabalho (ponto 4.6 e 4.7).

4.6 Atividade Antioxidante

O interesse por antioxidantes naturais pela indústria farmacêutica e alimentar tem vindo a crescer exponencialmente nos últimos anos, resultado de inúmeras pesquisas desenvolvidas

nos ramos da química e biologia ^[172]. As plantas contêm compostos antioxidantes que conseguem funcionar como captadores de radicais livres, agentes redutores e supressores da formação de oxigênio singlete ^[76]. Dos antioxidantes sintéticos existentes no mercado, ganham destaque o hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA), os quais são usualmente utilizados pelas suas propriedades antioxidante na indústria alimentar, cosméticos e farmacêuticos. No entanto, a alta volatilidade e instabilidade a temperaturas elevadas, a legislação rigorosa e a natureza cancerígena de alguns dos antioxidantes sintéticos, têm conduzido a um aumento significativo na procura de antioxidantes naturais igualmente potentes, mas que ao contrário dos sintéticos, são mais baratos, e além disso, não são prejudiciais para a saúde. Por serem compostos naturais, não que dizer que seja 100 % seguro, por isso é sempre importante que quando novos compostos com atividade antioxidante, são extraídos de plantas ou frutos sejam implementados estudos biológicos *in vivo* e *in vitro*, de modo a não comprometer o bem-estar físico do consumidor final. A ingestão de plantas medicinais e alimentos ricos em compostos com atividade antioxidante diminui a incidência de certas doenças ^{[7], [160]}.

De acordo com os resultados apresentados nos pontos 4.1 e 4.2, ficou demonstrado que o extrato de dezembro, e o respetivo sobrenadante foram as amostras que apresentaram maior concentração em compostos fenólicos e melhor atividade antioxidante (de acordo com o método do DPPH). Por essa razão, a determinação da atividade antioxidante, foi desenvolvida somente para o extrato de dezembro e respetivo sobrenadante. A atividade antioxidante foi avaliada para as duas amostras, quer no sequestro de radicais livres (DPPH e NO) quer na inibição da peroxidação lipídica. Os valores de EC₅₀ e IC₅₀ foram comparados com padrões antioxidantes, como o BHT, ácido ascórbico, e com os dois compostos principais do extrato aquoso de *Actinidia deliciosa*, rutina e quercitrina (Figuras 86-88). Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

4.6.1 Método do DPPH

Dos valores de EC₅₀ obtidos para a atividade antioxidante (Figura 86), de acordo com o método do DPPH, é perceptível que, o sobrenadante resultante da precipitação das mucilagens do extrato de dezembro, apresentou um valor de EC₅₀ mais baixo quando comparado com o extrato inicial, com já tinha sido referido no ponto 4.2.2. O sobrenadante consegue mesmo ser melhor que o padrão antioxidante BHT. Os padrões de rutina e quercitrina, apresentam valores de EC₅₀ baixos, com maior destaque para a quercitrina que mostra ser, de entre as

amostras analisadas, o composto com maior capacidade de reduzir o radical DPPH. Como demonstrado anteriormente, a quantidade em quercitrina no extrato de dezembro é maior, e no sobrenadante é significativamente maior, assim será de esperar que quanto maior for o seu conteúdo de quercitrina, maior será a atividade antioxidante da amostra.

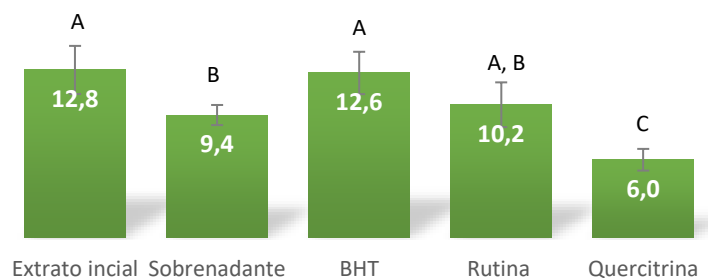


Figura 86: Valores de EC₅₀ (µg/mL) para a atividade antioxidante, de acordo com o método do DPPH, para o extrato de dezembro e respetivo sobrenadante, bem como para os padrões/antioxidantes comerciais. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.

Comparativamente a outros extratos aquosos (nos quais EC₅₀ ≥ 18,6 µg/mL)^[36] utilizados na medicina tradicional, o extrato de *Actinidia deliciosa* de dezembro e o respetivo sobrenadante apresentam valores de EC₅₀ consideravelmente mais baixos, o que é um indicativo de maior poder antioxidante.

4.6.2 Atividade Sequestradora de Radicais de Óxido Nítrico

Tal como acontecia no ensaio anterior para o ensaio do DPPH, também neste ensaio a atividade antioxidante do sobrenadante é substancialmente melhor comparativamente ao extrato antes da purificação, revelando mesmo ser melhor que os padrões de rutina e quercitrina (Figura 87). No entanto, o valor de IC₅₀ ainda é consideravelmente maior que o padrão de vitamina C. Ainda assim é possível afirmar que o sobrenadante apresenta uma eficaz captação de radicais de óxido nítrico.

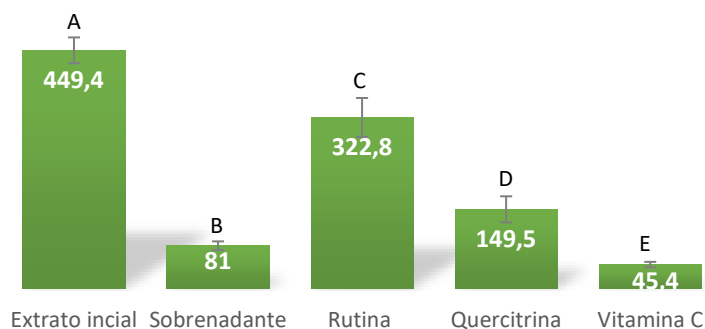


Figura 87: Valores de IC₅₀ (µg/mL) para a atividade antioxidante, avaliando a capacidade captadora de radicais NO, do extrato de dezembro e respectivo sobrenadante, bem como para os padrões/antioxidantes comerciais. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.

Comparativamente com outros extratos etanólicos utilizados na medicina tradicional (nos quais IC₅₀ ≥ 92,5 µg/mL), o sobrenadante de *Actinidia deliciosa* de dezembro, apresenta menor valor de IC₅₀, que é um indicativo de maior capacidade de eliminação dos radicais de óxido nítrico [173].

4.6.3 Inibição da Peroxidação Lipídica – Método dos TBARS

Quanto à capacidade de inibição da peroxidação do extrato de dezembro (Figura 88), verifica-se que ambos possuem efeito protetor nos lípidos, no entanto quando comparado com o padrão antioxidante BHT os valores de IC₅₀ são consideravelmente maiores. Ainda assim como acontecia para os dois métodos anteriores, também neste ensaio o sobrenadante revela ter maior atividade antioxidante.

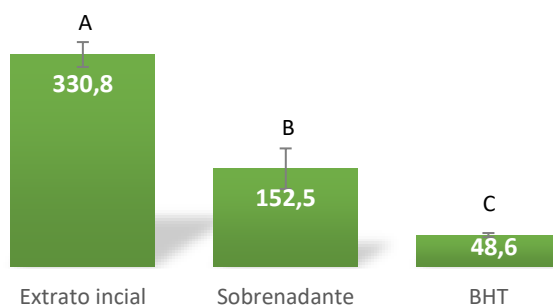


Figura 88: Valores de IC₅₀ (µg/mL) para a atividade antioxidante, ensaio dos TBARS, para o extrato de dezembro e respectivo sobrenadante, bem como para os padrões/antioxidantes comerciais. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.

Porém, comparativamente com outros extratos metanólicos (nos quais IC₅₀ ≥ 270 µg/mL) [174], o sobrenadante de *Actinidia deliciosa* de dezembro, apresenta menor valor de IC₅₀, que é um indicativo de maior capacidade em inibir a peroxidação lipídica.

4.7 Inibição da Acetilcolinesterase

Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) são eficazes a retardar o processo neuro degenerativo, e podem ser usados para aumentar a motilidade gastrointestinal. Nos últimos anos tem-se denotado uma enorme procura por inibidores naturais que consigam boa atividade inibitória da AChE, e que possam fazer face aos inibidores sintéticos existentes no mercado ^{[36], [74]}. De acordo com estudos realizados, flavonoides como a rutina e a quercitrina possuem efeito inibitório sobre a AChE ^[62].

A determinação da atividade inibitória da AChE, foi desenvolvida para o extrato de dezembro e respetivo sobrenadante, uma vez que estas duas amostras foram as que demonstraram maior conteúdo fenólico e atividade antioxidante. Os valores de IC₅₀ estão representados na Tabela 11. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

Tabela 11: Valores de IC₅₀ (µg/mL) para a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, para o extrato de dezembro e respetivo sobrenadante, bem como para os padrões de quercitrina e rutina.

Amostra	IC ₅₀ (µg/ mL)
Extrato inicial	794 ± 9,5
Sobrenadante	567,1 ± 36,6
Rutina	86 ± 4 ^[62]
Quercitrina	62 ± 2 ^[62]

Analisando os resultados obtidos, é possível constatar que, tanto o extrato como o sobrenadante apresentam atividade inibitória da enzima. No entanto, comparativamente aos padrões de quercitrina e rutina, os valores IC₅₀ para o extrato e sobrenadante são muito mais elevados. O sobrenadante, ainda assim, revelou ser mais eficaz na inibição da enzima, em relação ao extrato. Ao comparar os valores obtidos para as duas amostras com outros extratos aquosos (nos quais IC₅₀ > 1050 µg/mL) ^[36], é possível constatar que os valores obtidos para o extrato e sobrenadante de *Actinidia deliciosa* são bastante satisfatórios, com valores de IC₅₀ significativamente inferiores.

4.8 Ensaios em Linhas Celulares Caco-2

Neste trabalho foram feitos ensaios *in vitro* em linhas celulares Caco-2. Inicialmente foram feitos testes de citotoxicidade, pelo método do MTT, do extrato de *Actinidia deliciosa* e do sobrenadante (resultante da precipitação das mucilagens). Foi também avaliada a permeação dos compostos fenólicos nas células do intestino e uma análise eletroforética para avaliar até que ponto a presença de mucilagens no extrato influenciaria a expressão proteica no citosol das células, após o processo de permeação.

4.8.1 Determinação da Citotoxicidade nas Linhas Celulares Caco-2

Para o extrato de outubro e respetivo sobrenadante, foi determinada a citotoxicidade (de acordo com o ponto 3.11.1). Para este ensaio foi testada uma gama de concentrações de extrato e de sobrenadante, no entanto não foi possível achar para nenhuma das amostras o IC_{50} , uma vez que seria necessária uma quantidade de amostra demasiado elevados para este ensaio. Como tal, optou-se por ver a percentagem de toxicidade para a concentração de 0,1 mg/mL de extrato e de sobrenadante (Tabela 12), uma vez que segundo a literatura o valor de IC_{50} a partir do qual a amostra é considerada tóxica é de 0,1 mg/mL ^[175].

Tabela 12: Toxicidade para o extrato e para o sobrenadante de outubro de 2015.

Amostra	Toxicidade para 0,1 mg/mL (%)
Extrato	2,3 ± 1,2
Sobrenadante	19 ± 4,1

Feita a análise dos resultados obtidos (Tabela 12) pode-se afirmar que tanto o extrato como o sobrenadante não são tóxicos ($IC_{50} > 0,1$ mg/mL). No entanto o valor de IC_{50} para o sobrenadante deverá ser muito inferior ao do extrato antes da precipitação das mucilagens. Este resultado poderá estar relacionado com o facto de no sobrenadante já não existir mucilagens e estas possuírem alguma proteção a nível celular que poderá explicar os resultados. Revelada a não toxicidade das duas amostras para estas linhas celulares, foi possível fazer o ensaio de permeação da rutina e quercitrina (ponto 4.8.2).

4.8.2 Biodisponibilidade e Permeação da Barreira Intestinal

Para o estudo da biodisponibilidade, foram adquiridos os cromatogramas da injeção das amostras recolhidas do lado apical, dentro das células e o lado basolateral das *Transwell*®. Para

os compostos que era possível identificar nos cromatogramas, rutina e quercitrina foi determinado o coeficiente de permeabilidade aparente (p_{app}), de acordo com o ponto 3.11.2. Além do cálculo do coeficiente, foi também determinada a percentagem de permeação da rutina e quercitrina, ou seja, percentagem de composto que permeou do lado apical para o basolateral.

Na tabela 13 estão representados os valores de P_{app} e as percentagens de permeação, depois de as células estarem 6 horas em contato o extrato de outubro de 2015 e respetivo sobrenadante resultante da precipitação com etanol. A quantidade de rutina e quercitrina presente no extrato e sobrenadante, foi aproximadamente igual em cada um dos ensaios (rutina $\approx 15 \mu\text{M}$; quercitrina $\approx 9 \mu\text{M}$). As quantidades destes dois flavonoides foram aproximadamente iguais para ser possível avaliar somente a influência das mucilagens presentes no extrato na permeação da rutina e quercitrina.

Tabela 13: Biodisponibilidade dos principais componentes (rutina e quercitrina) do extrato e sobrenadante de *Actinidia deliciosa* através das monocamadas Caco-2.

Amostra	Composto	Biodisponibilidade	
		Basolateral (%)	$P_{app} \text{ AP-BL } (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$
Extrato	Rutina	$10,4 \pm 1,2$	$8,1 \pm 0,9$
	Quercitrina	$10 \pm 0,9$	$7,6 \pm 0,7$
Sobrenadante	Rutina	$5,7 \pm 1,3$	$3,6 \pm 1,6$
	Quercitrina	$4,4 \pm 2,3$	$3,4 \pm 1,8$

Analisando os valores da biodisponibilidade, presentes na Tabela 13, é possível verificar que, tanto a rutina como a quercitrina, têm valores de p_{app} e percentagem de permeação idênticos, tanto para o extrato como para o sobrenadante. Os valores de coeficiente de permeabilidade adquiridos no presente trabalho mostraram ser melhores, comparativamente aos valores reportados pela literatura para padrões de rutina e quercitrina, $1,24 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ^[176] e $2,7 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ^[177], respetivamente.

A permeabilidade dos compostos fenólicos é consideravelmente afetada pela matriz onde estes compostos estão presentes, podendo ocorrer interações dos fenóis com proteínas, hidratos de carbono, fibras e gorduras ^[178]. As matrizes podem atrasar a disponibilidade dos compostos fenólicos, mas também podem estabilizá-los ou oferecer-lhes proteção contra reações adicionais, até que atinjam o local de absorção ^[179].

A permeabilidade da rutina e da quercitrina no extrato é superior comparativamente ao sobrenadante (Tabela 13). O extrato de *Actinidia deliciosa* é constituído por uma quantidade muito significativa de mucilagens (ponto 4.1.5). As interações entre as mucilagens, estrutura polissacárida, (como referido no ponto 1.6) e a rutina e quercitrina, aparentam ter um papel importante na permeabilidade destes dois flavonoides, explicando assim os valores obtidos na Tabela 13. De acordo com um estudo desenvolvido em ratinhos, os investigadores verificaram que a ingestão de rutina com pectina (estrutura polissacárida), aumentava a biodisponibilidade da rutina. No entanto também constataram que este efeito sinérgico está muito dependente do tipo de fibra presente na matriz ^[180]. Contrariamente, o sobrenadante já não possui esta estrutura polissacárida, logo a ausência deste tipo de interações pode ter conduzido à sua baixa biodisponibilidade.

Estruturalmente, os compostos fenólicos possuem anéis aromáticos e grupos hidroxilo com a capacidade de se ligarem a proteínas e polissacáridos, presentes na superfície das células através de ligações de hidrogénio, interações hidrofóbicas e ligações covalentes, tais como ligações éster entre ácidos fenólicos e polissacáridos.

A capacidade dos compostos fenólicos se ligarem a proteínas, já como referido anteriormente, deve ser considerada na determinação da biodisponibilidade global. Na literatura tem vindo a ser discutida a existência de ligações intermoleculares entre albumina do soro e polifenóis, conduzindo a um decréscimo na biodisponibilidade dos compostos fenólicos ^[179]. No sobrenadante, os fenóis estarão neste caso mais vulneráveis (ausência de mucilagens) e ligar-se-ão mais facilmente às proteínas do meio de cultura, levando a um decréscimo na permeação.

4.8.3 Análise Eletroforética (SDS-PAGE) de Proteínas Totais após Ensaio de Permeação nas Caco-2.

Antes de se proceder à análise das diferentes amostras no eletroforama (Figura 89), é necessário traçar a reta de calibração com o marcador de proteínas para determinar as massas moleculares relativas (M_r) presentes em cada uma das amostras em análise. Primeiro é necessário calcular o fator de retardação (R_f) de cada banda. Este coeficiente é calculado através da fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela mancha}}{\text{distância percorrida pela frente do corante}}$$

Depois de calculado o fator de retardação de cada banda do marcador, é feita a representação gráfica do $\log(Mr)$ em função do fator de retardação (R_f):

Reta de calibração:

$$\log_{10} Mr = -1,4293 \times R_f + 5,6487 \quad (R^2 = 0,9909)$$

O eletroforama (Figura 89) foi adquirido (de acordo com o ponto 3.11.3) para a análise da expressão proteica no citosol das células cultivadas em *Transwell*®. Foi analisada a expressão proteica das células que estiveram somente em contato com o meio de cultura (RPMI + L-glutamina + pen-strep e FBS – ponto 3.2), com o extrato de outubro de 2015 e com o respectivo sobrenadante, resultante da precipitação do extrato com etanol.

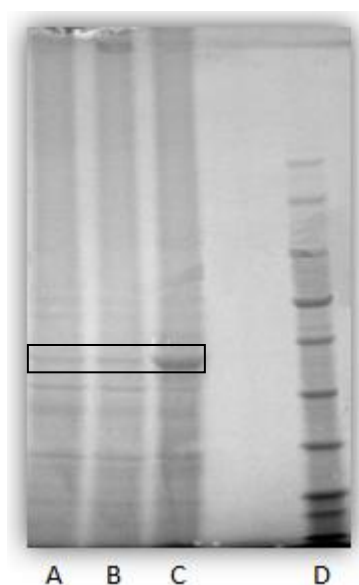


Figura 89: Eletroforama obtido da SDS-PAGE: (A) controle, (B) extrato, (C) sobrenadante e (D) marcador de proteínas.

Na Tabela 14, estão representadas as massas relativas das proteínas presentes em cada uma das amostras. No entanto algumas bandas só foram visíveis para o sobrenadante, como a banda a 36 mm, 41 mm, 64 mm e a 65 mm.

Tabela 14: Valores de R_f , logaritmo e respectivas massas moleculares relativas das proteínas do citosol das células em contato somente com o meio de cultura (controle) (A), extrato (B) e sobrenadante (C). ^a bandas visíveis somente no sobrenadante.

Distância percorrida por cada banda (mm)	Mr (kDa)
36^a	106,85
41^a	87,63
45	74,77
47	69,08
50	61,33
51	58,95
54	52,34
56	48,34
58	44,66
61	39,65
64^a	35,20
65^a	33,84
68	30,04
70	27,75
71	26,67
73	24,64
75	22,76
81	17,94

Analisando a Figura 89 e os dados da Tabela 14, é possível verificar que a expressão proteica da maioria das proteínas foi semelhante nas três amostras, no entanto quando as células estiveram na presença do sobrenadante, verificaram-se diferenças na expressão proteica no citosol da célula. No sobrenadante, ao contrário das células que estiveram em contato com o extrato e com o meio de cultura, são visíveis proteínas de massas moleculares relativas de 33,84 kDa, 35,20 kDa, 87,63 kDa e 106,85 kDa (Tabela 14). Estas proteínas poderão estar, tanto no extrato como no controle, mas por apresentarem uma expressão tão baixa, tornam-se de difícil detecção. No entanto algumas bandas (proteínas) são concordantes e com intensidades muito semelhantes, com a exceção das proteínas com massa de 52,34 kDa, que no caso das células que estiveram em contato com o sobrenadante, teve o dobro da intensidade (Figura 89). A comparação das intensidades de cada banda do gel foi conseguida através do programa de processamento de imagens *ImageJ*.

No sobrenadante, existiu claramente uma diferença na expressão proteica das proteínas do citosol, que pode ter sido uma consequência de diferenças na quantidade de rutina e quercitrina, que possam ter ficado retidas no interior das células. Assim foi determinada a quantidade de rutina e quercitrina dentro das células, para perceber se uma maior/menor

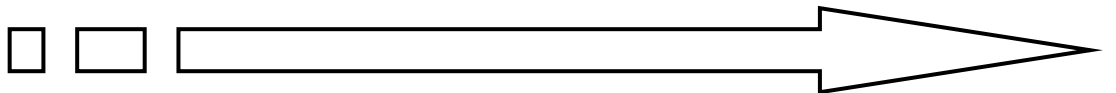
percentagem destes compostos no interior da célula poderia explicar as diferenças verificadas anteriormente. Na Tabela 15 estão representadas as percentagens de quercitrina e rutina presentes no interior das células, verificando-se que no interior das células ficou somente uma pequena porção (<1 %) tanto de quercitrina como de rutina, ficando a maior percentagem no lado apical da *Transwell*®.

Tabela 15: Percentagem de quercitrina e rutina presente no interior das células Caco-2 após ensaio de permeabilidade, das células em contato com o extrato e com o sobrenadante (resultante da precipitação de mucilagens)

	Extrato	Sobrenadante
Rutina (%)	0,09 ± 0,01	0,36 ± 0,03
Quercitrina (%)	0,14 ± 0,01	0,47 ± 0,01

O sobrenadante comparativamente ao extrato tem sempre maior quantidade de rutina e quercitrina no interior das células, apesar de serem quantidades muito pequenas. No entanto estas pequenas variações podem explicar as diferenças na expressão proteica das proteínas do citosol quando na presença de extrato e sobrenadante (Tabela 14-15).

Capítulo V – Conclusão e Perspetivas Futuras



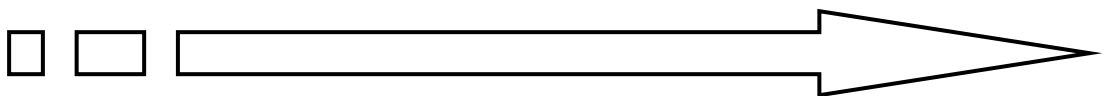
O trabalho experimental apresentado e desenvolvido nesta dissertação, teve como principal objetivo o aproveitamento das folhas de *Actinidia deliciosa*, resultantes do processo de poda da planta. De acordo com os resultados obtidos ao longo deste trabalho, foi possível verificar que as folhas de *Actinidia deliciosa* (recolhidas na altura da poda da planta) podem ser encaradas como uma fonte importante de compostos bioativos, entre os quais compostos fenólicos, e as suas atividades biológicas inerentes revelaram-se muito interessantes quer para a indústria alimentar, quer para a indústria farmacêutica. Ao extrato aquoso das folhas de *Actinidia deliciosa*, foram aplicados diferentes processos de purificação, e os melhores resultados foram obtidos para a precipitação com etanol. Os compostos fenólicos obtidos com a precipitação com etanol, mostraram ter elevada atividade anti-acetilcolinesterase e capacidade antioxidante, não só para eliminar os radicais livres, mas também para evitar a peroxidação de lípidos.

Do trabalho desenvolvido em linhas celulares Caco-2, para o extrato de *Actinidia deliciosa* e para a fração fenólica (resultante da precipitação das mucilagens), ficou demonstrado que as duas amostras não são citotóxicas, a permeação da rutina e da quercitrina, é facilitada pela presença de mucilagens no extrato. A análise eletroforética revelou que as células que estiveram em contato com a fração fenólica (sem mucilagens) viram a expressão proteica das proteínas do citosol alterada.

Os resultados adquiridos neste trabalho revelaram ser bastante promissores. No entanto, seria interessante desenvolver mais alguns estudos:

- Avaliar a permeação da rutina e quercitrina nas Caco-2 depois de estarem em contato com as amostras durante 24 horas, para ver se os resultados adquiridos depois de 6h (tempo no qual foi avaliada a permeação neste trabalho), revelavam igualmente que a permeabilidade da quercitrina e rutina no extrato é maior.
- Quantificar outros fitoquímicos que possam estar presentes no extrato, e que possam tal como se fez para as mucilagens, arranjar métodos que os isolem e com isso aumentar a quantidade de compostos fenólicos por miligrama de extrato.
- Avaliar as modificações nos metabolitos das células depois de um ensaio de permeação

Capítulo VI – Referências



- [1] J. Deng, Q. Liu, C. Zhang, W. Cao, *et al.* *Extraction Optimization of Polyphenols from Waste Kiwi Fruit Seeds (Actinidia chinensis Planch.) and Evaluation of Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties*. *Molecules*, 2016, vol. 21, p. 1-13.
- [2] A. Scalbert, I. T. Johnson, M. Saltmarsh, *Polyphenols: Antioxidants and Beyond*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, vol. 81, p. 215S-217S.
- [3] J. Wollgast, E. Anklam, *Polyphenols in Chocolate: Is There a Contribution to Human Health?* *Food Research International*, 2000, vol.33, p. 449-459.
- [4] K. B. Pandey, S. I. Rizvi, *Plant Polyphenols as Dietary Antioxidant in Human Health and Disease*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009, vol. 2, p. 270-278.
- [5] H. A. Ahad, P. Yesupadam, P. Ramyasree, B. Suma Padmaja, M. Sravanthi, G. Prakash, *Isolation and Physicochemical Characterization of Hibiscus rosa-sinensis Leaves Mucilage*. *International Journal of Current Research*, 2011, vol. 3, p. 210-212.
- [6] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, *et al.* *Polyphenols: Food Sources and Bioavailability*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, vol. 79, p. 727-47.
- [7] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, *Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health*. *Pharmacognosy Review*, 2010, vol. 4, p. 118-126.
- [8] K. V. Shastri, V. Bhatia, P. R. Parikh, V. N. Chaphekar, *Actinidia deliciosa: A Review*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, ISSN 0975-8232, 2012, vol. 3, p. 3543-3549.
- [9] F. Debersaques, O. Mekers, *Growth and Production of Kiwifruit and Kiwiberry*. *Soils, Plant Growth and Crop Production*, 2010, vol. 2.
- [10] <http://www.theblackpeppercorn.com/2013/03/golden-kiwifruit/> (Consultado a 18 de outubro de 2015).
- [11] <http://www.kiwiberry.com/annas.htm> (Consultado a 28 de outubro de 2015).
- [12] Instituto Nacional de Estatística, *Estatísticas Agrícolas 2013*, Edição 2014, ISSN 0079-4139.
- [13] Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Gabinete de Planeamento e Políticas. *Kiwi*, 2007.

- [14] Disqual, *Optimização da Qualidade e Redução de Custos na Cadeia de Distribuição de Produtos Hortofrutícolas Frescos-Manual de Boas Práticas*. Programa Praxis XXI.
- [15] C. Ward, D. Courtney, *Kiwifruit: Taking its Place in the Global Fruit Bowl*. Advances in Food and Nutrition Research, ISSN 1043-4526, 2013, vol. 68.
- [16] E. Bursal, I. Gülçin, *Polyphenol Contents and in Vitro Antioxidant Activities of Lyophilised Aqueous Extract of Kiwifruit (Actinidia deliciosa)*. Food Research International, 2011, vol. 44, p. 1482-1489.
- [17] E. H. Lahlou, N. Hirai, T. Kamo, M. Tsuda, H. Ohigashi, *Actinidic Acid, A New Triterpene Phytoalexin from Unripe Kiwi Fruit*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, vol. 65, p. 480-483.
- [18] K. V. Wurms, M. P. George, D. R. Lauren, *Involvement of Phenolic Compounds in Host Resistance Against Botrytis cinerea in Leaves of the Two Commercially Important Kiwifruit (Actinidia chinensis and A. deliciosa) Cultivars*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2003, vol. 31, p. 221-233.
- [19] R. Webby, *Flavonoid Complement of Cultivars of Actinidia deliciosa var. deliciosa, Kiwifruit*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1990, vol. 18, p. 1-4.
- [20] https://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/cejka_laur/adaptation.htm (Consultado a 1 de agosto de 2016).
- [21] M. D. Mendes, *Caracterização Química e Molecular de Espécies das Famílias Lamiaceae e Apiaceae da Flora Aromática de Portugal*. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia, Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências, 2007.
- [22] D. H. S. Gracelin, A. John de Brito, P. J. R. Kumar, *Qualitative and Quantitative Analysis of Phytochemicals in Five Pteris Species*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, ISSN- 0975-1491, 2013, vol. 5, p. 105-107.
- [23] L. Gobbo-Neto, N. P. Lopes, *Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários*. Química Nova, São Paulo, ISSN 1678-7064, 2007, vol. 30, p. 374-381.
- [24] Apontamentos da aula de Produtos Naturais e Medicinais do 1º semestre/ 1º ano de Mestrado em Química. Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências, 2014. A bibliografia da disciplina é: R. O. B. Wijesekera, *The Medicinal Plant Industry*. CRC Press, 1991; J. Mann,

Chemical Aspects of Biosynthesis. Oxford Chemistry Primers, Oxford University Press, Oxford 1994

[25] A. Crozier, I. B. Jaganath, M. N. Clifford, Dietary Phenolics: Chemistry, Bioavailability and Effects on Health. *Natural Product Reports*, 2009, vol. 26, p. 1001-1043.

[26] K. Nguyen, M. Chollet-Krugler, S. Tomasi, UV-Protectant Metabolites from Lichens and their Symbiotic Partners. *Natural Product Reports*, 2013, vol. 30, p. 1490-1508.

[27] C. M. Sousa, H. Rocha e Silva, M. C. Ayres, *et al.* Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de cinco Plantas Medicinais. *Química Nova*, 2007, Vol. 30, No. 2, p. 351-355.

[28] P. M. Ângelo, N. Jorge, *Compostos Fenólicos em Alimentos – Uma Breve Revisão*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 2007, Vol. 66, No. 1, p. 1-9.

[29] J. Dai, R. J. Mumper, *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties*. *Molecules*, 2010, vol. 15, p. 7313-7352.

[30] B. Nayak, B., F. Dahmnoune, F., K. Moussi, K., H. Remini, *et al.* Comparison of Microwave, Ultrasound and Accelerated-Assisted Solvent Extraction for Recovery of Polyphenols from *Citrus sinensis* Peels. *Food Chemistry*, 2015, vol. 187, p. 507-516.

[31] Y. He, Q. Lu, G. Liviu, 2015. *Effects of Extraction Processes on the Antioxidant Activity of Apple Polyphenols*. *Cyta – Journal of Food*, 2015, vol. 13, p. 603-606.

[32] A. N. Mustapa, Á Martin, R. B. Mato, M. J. Cocero, *Extraction of Phytocompounds from the Medicinal Plant Clinacanthus nutans Lindau by Microwave-Assisted Extraction and Supercritical Carbon Dioxide Extraction*. *Industrial Crops and Products*, 2015, vol. 74, p. 83-94.

[33] V. Chandrasekar, M.F. San Martín-González, P. Hirst, T. S. Ballard, *Optimizing Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants From Red delicious and Jonathan Apple pomace*. *Journal of Food Process Engineering*, 2015, vol. 38, p. 571-582.

[34] L. Xavier, M. S. Freire, I. Vidal-Tato, *Application of Aqueous Two Phase Systems Based on Polyethylene Glycol and Sodium Citrate for the Recovery of Phenolic Compounds From Eucalyptus wood*. *Ciencia y tecnologia.*, 2015, vol. 17, p. 345-354.

[35] F. Hajji, B. Kunz, J. Weissbrodt, *Polymer Incompatibility as a Potencial Tool for Polyphenol Recovery from Olive Mill Wastewater*. *Food Chemistry*, 2014, vol. 156, p. 23-28.

- [36] P. L. Falé, C. Ferreira, A. M. Rodrigues, P. Cleto, P. J. Amorim, *et al. Antioxidant and Anti-Acetylcholinesterase Activity of Commercially Available Medicinal Infusions After in vitro Gastrointestinal Digestion*. Journal of Medicinal Plants Research, 2013, vol. 7, p. 1370-1378.
- [37] P.L. Falé, P. J. A. Madeira, M. H. Florêncio, L. Ascensão, M. L. M. Serralheiro, Function of Plectranthus barbatus Herbal Tea as Neuronal Acetylcholinesterase Inhibitor. Food & Function, 2011, vol. 2, p. 130-136.
- [38] P. L. Falé, *Biological Activities of Plectranthus Barbatus Aqueous Extracts, In Vitro and In Vivo Studies of Activity, Bioavailability and Metabolism*. Tese de Doutoramento em Bioquímica, Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências, 2011.
- [39] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, *Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer*. Life Science, 2004, vol.74, p. 2157-2184.
- [40] N. R. Bernardes, L. Glória, C. Nunes, *et al. Quantificação dos Teores de Taninos e Fenóis Totais e Avaliação da Atividade Antioxidante dos Frutos de Aroeira*. Vértices, 2011, vol. 18, p. 117-128.
- [41] K. Khanbabaee, T. Ree, *Tannins: Classification and Definition*. Natural Product Report, 2001, vol. 18, p. 641-649.
- [42] M. J. Cabrita, J. Ricardo da Silva, O. Laureano, *Os Compostos Polifenólicos das Uvas e dos Vinhos*. I Seminário Internacional de Vinicultura. Instituto Superior Técnico de Lisboa.
- [43] M. L. R. Giada, *Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power*. Intech, 2013, chap 4.
- [44] J. M. Monteiro, U. P. de Albuquerque, E. L. Araújo, Taninos: Uma Abordagem da Química à Ecologia. Química Nova, 2005, vol. 28, p. 892-896.
- [45] Sigma-Aldrich®: <https://www.sigmaaldrich.com>
- [46] M. Guinazi, R. C. Milagres, H. M. Pinheiro-Sant'Ana, J. B. P. Chaves, *Tocoferóis e Tocotrienóis em Óleos Vegetais e Ovos*. Química Nova, 2009, vol. 32, p. 2098-3103.
- [47] Catálogo Sigma-Aldrich® <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t3251?lang=pt®ion=PT> (Consultado a 2 de julho)

- [48] K. Muffler, D. Leipold, M. Scheler, C. Haas, *et al. Biotransformation of Triterpenes*. Process Biochemistry, 2011, vol. 46, p. 1-15.
- [49] J. S. Negi, P. S. Negi, G. J. Pant, M. S. M. Rawat, S. K. Negi, Naturally Occurring Saponins: Chemistry and Biology. Journal of Poisonous and Medicinal Plant Research, 2013, vol. 1, p. 001-006.
- [50] E. Lesellier, E. Destandau, C. Grigoras, L. Fougère, C. Elfakir, *Fast Separation of Triterpenoids by Supercritical Fluid Chromatography/Evaporative Light Scattering Detector*. Journal of Chromatography A, 2012, vol. 1268, p. 157-165.
- [51] H. Sheng, H. Sun, *Synthesis, Biology and Clinical Significance of Pentacyclic Triterpenes: A Multi-Target Approach to Prevention and Treatment of Metabolic and Vascular Diseases*. Natural Product Reports, 2011, vol. 28, p. 543-593.
- [52] M. E. Ghanem, R. Han, B. Classen, *et al. Mucilage and Polysaccharides in the Halophyte Plant Species Kosteletzkya Virginica: Localization and Composition in Relation to Salt Stress*. Journal of Plant Physiology, 2010, vol. 167, p. 382-392.
- [53] A. Ameri, G. Heydarirad, *et al. Medicinal Plants Contain Mucilage Used in Traditional Persian Medicine (TPM)*. Review Article, Pharmaceutical Biology, 2014, ISSN 1388-0209.
- [54] M. A. Shende, R. P. Marathe, *Extraction of Mucilages and its Comparative Mucoadhesive Studies from Hibiscus Plant Species*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2015, vol. 4, p. 900-924.
- [55] M. B. Čolović, D. Z. Krstić, T. D. Lazarević-Pašti, *et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology*. Current Neuropharmacology, 2013, vol. 11, p. 315-335.
- [56] E. Petronilho, A. C. Pinto, J. D. F. Villar, *Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química*. Revista Militar de Ciência e Tecnologia, ISSN 2316-4522, 2011, vol. 28, p.3-14.
- [57] <http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/vol37/n2/74.htm> (Consultado a 17 de novembro de 2015).
- [58] G. L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford University Press, 1995.
- [59] C. V. Junior, V. Bolzani, M. Furlan, C.A Fraga, E. J. Barreiro, *Produtos Naturais como Candidatos a Fármacos Úteis no Tratamento do Mal de Alzheimer*. Química Nova, 2004, vol. 27, p. 655-660.

- [60] M. M. Oh, J. M. Power, L. T. Thompson, P. L. Moriearty, J. F. Disterhoft, *Metrifonate Increases Neuronal Excitability in CA1 Pyramidal Neurons from Both Young and Aging Rabbit Hippocampus*. Journal of Neuroscience, 1999, vol. 19, p. 1814-1823.
- [61] R. Cacabelos, *Donepezil in Alzheimer's Disease: From a Conventional Trials to Pharmacogenetics*. Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2007, vol. 3, p. 303-333.
- [62] M. F. Hernandez, P. L. V. Falé, M. E. Araújo, M. L. Serralheiro, *Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of the Water Extracts of Several Hypericum Species*. Food Chemistry, 2010, vol. 120, p. 1076-1082.
- [63] Associação Portuguesa de Familiares e Amigos dos Doentes de Alzheimer.
- [64] A. Sereniki, M. A. B. Vital, *A Doença de Alzheimer: Aspectos Fisiopatológicos e Farmacológicos*. Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul, 2007, vol. 30.
- [65] National Institute on Aging (NIH): http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/progress_report_pg34high.jpg (Consultado a 17 de maio de 2016)
- [66] M. L. Kerr, D. H. Small, *Cytoplasmic Domain of the β -Amyloid Protein Precursor of Alzheimer's Disease: Function, Regulation of Proteolysis, and Implications for Drug Development*. Journal of Neuroscience Research, 2005, vol.80, p. 151-159.
- [67] S. Lovestone, C. H. Reynolds, D. Latimer, D. R. Davis, et al. *Alzheimer's Disease-like Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau by Glycogen Synthase kinase-3 in Transfected Mammalian Cells*. Current Biology, 1994, vol. 4, p. 1077-1086.
- [68] R. J. Castellani, G. Perry, *The Complexities of the Pathology–Pathogenesis Relationship in Alzheimer Disease*. Biochemical Pharmacology, 2014, vol. 88, p. 671-676.
- [69] F. K. Salawu, J. T. Umar, A. B. Olokoba, *Alzheimer's Disease: A Review of Recent Developments*. Annals of African Medicine, 2011, vol. 10, p. 73-79.
- [70] A. T. Mata, C. Proença, A. R. Ferreira, M. L. M. Serralheiro, et al. *Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Five Plants Used as Portuguese Food Spices*. Food Chemistry, 2007, vol. 103, p. 778-786.

- [71] M. Heinrich, H. L. Teoh, *Galanthamine from Snowdrop—The Development of a Modern Drug Against Alzheimer's Disease from Local Caucasian Knowledge*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, vol. 92, p. 147-162.
- [72] D. M. Pereira, F. Ferreres, J. M. A. Oliveira, L. Gaspar, *et al. Pharmacological Effects of Catharanthus roseus Root Alkaloids in Acetylcholinesterase Inhibition and Cholinergic Neurotransmission*. Phytomedicine, 2010, vol. 17, p. 646-652.
- [73] P. Holzer, C. A. Maggi, *Synergistic Role of Muscarinic Acetylcholine and Tachykinin NK-2 Receptors in Intestinal Peristalsis*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1994, vol. 349, p. 194-201.
- [74] R. J. Ponc, M. D. Saunders, M. B. Kimmey, *Neostigmine for the Treatment of Acute Colonic Pseudo-Obstruction*. The New England Journal of Medicine, 1999, vol. 341, p. 137-141
- [75] H. Zhu, Y. R. Li, *Oxidative Stress and Redox Signaling Mechanisms of Inflammatory Bowel Disease: Updated Experimental and Clinical Evidence*. Experimental Biology and Medicine, 2012, vol.237, p. 474-480.
- [76] S. O. Okoh, O. T. Asekun, O. B. Familoni, A. J. Afolayan, *Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacity of Seed and Shell Essential Oils Extracted from Abrus precatorius (L)*. Antioxidants, ISSN 2076-3921, 2014, vol. 3, p. 278-287.
- [77] B. Halliwell, M. Whiteman, *Measuring Reactive Species and Oxidative Damage In Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It And What Do The Results Mean?*. British Journal of Pharmacology, 2004, vol. 142, p. 231-255.
- [78] F. M. F. Roleira, E. J. Tavares-da-Silva, C. L. Varela, *et al. Plant Derived and Dietary Phenolic Antioxidants: Anticancer Properties*. Food Chemistry, 2015, vol. 183, p. 235-258.
- [79] J. P. Dzoyem, J. N. Eloff, *Anti-inflammatory, Anticholinesterase and Antioxidant Activity of Leaf Extracts of Twelve Plants used Traditionally to Alleviate Pain and Inflammation in South Africa*. Journal of Ethnopharmacology, 2015, vol. 160, p. 194-201.
- [80] S. Dalleau, M. Baradat, F. Guéraud, L. Huc, *Cell Death and Diseases Related to Oxidative Stress:4-Hydroxynonenal (HNE) in The Balance*. Cell Death & Differentiation, 2013, vol. 20, p. 1615-1630.

- [81] V. Vaithiyathan, S. Mirunalini, *Assessment of Antioxidant Potential and Acute Toxicity Studies of whole Plant Extract of Pergularia daemia* (Forsk). *Toxicology International* vol. 22, p. 54-60.
- [82] D. Mafra, D. S. P. Abdalla, *Peroxidação Lipídica em Pacientes com Insuficiência Renal Crônica*. *Revista de Nutrição*, 1999, vol. 12, p. 205-212.
- [83] K. B. Barbosa, N. M. B. Costa, R. Alfenas, S. Oliveira de Paula, *et al. Estresse Oxidativo: Conceito, Implicações e Fatores Modulatórios*. *Revista de Nutrição*, 2010, vol. 23, p. 629-643.
- [84] SGS, *Caco-2 Cellular System: An Overview*. Technical Bulletin Life Science, February 2011, No. 41.
- [85] C. A. Bailey, P. Bryla, A. W. Malick, *The Use of the Intestinal Epithelial Cell Culture Model, Caco-2, in Pharmaceutical Development*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, Vol. 22, p. 85-103.
- [86] I. Hubatsch, E. Ragnarsson, P. Artursson, *Determination of Drug Permeability and Prediction of Drug Absorption in Caco-2 Monolayers*. *Nature Protocols*, Vol. 2, No. 9, p. 2111-2119.
- [87] M. F. Duarte, *Espetrometria de Massa de Electrospray – Técnica do Presente e do Futuro*. Sociedade Portuguesa de Química, 2001.
- [88] T. Jorge, *Nutrientes e Suplementos Nutricionais em Vegetais e Frutos Frequentemente usados na Dieta: Estudo por Espectrometria de Massa do Resveratol nas Uvas*. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências, 2012.
- [89] http://attic.gsfc.nasa.gov/huygensgcms/MS_Detector_1.htm (consultado a 1 de julho de 2016).
- [90] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/advanced-chemistryprize2002.pdf (consultado a 7 de março de 2016).
- [91] <https://nanotechnologysolutions.wordpress.com/category/electrospray/> (Consultado a 7 de março de 2016).
- [92] N. B. Cech, C. G. Enke, *Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2001, vol. 20, p. 362-387.

- [93] H. J. Dias, N. Isabel de Melo, A. E. M. Crotti, *Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry as a Tool for the Structural Elucidation and Dereplication of Natural Products: An Overview*. Tandem Mass Spectrometry – Application and Principles, 2012, chap. 25, p. 596-618.
- [94] S. J. Gaskell, *Electrospray: Principles and Practice*. Journal of Mass Spectrometry, 1997, vol. 32, p. 677-688.
- [95] N.N. Gouveia, *Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica para Determinação de Aminas Biogénicas em Tunídeos*. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Aplicada, Universidade da Madeira, 2009.
- [96] M.H. Florêncio, P.J. Amorim, *Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies*. Tandem Mass Spectrometry- Applications and Principles, Prasain, ISBN 978-953-51-0141-3, 2012.
- [97] <http://www.shodex.net/index.php?lang=9&applic=1472> (Consultado a 2 de março de 2016).
- [98] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3ª Edição, Wiley & Sons, 2010.
- [99] S. Gomes, *Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Eletroquímica*. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade de Coimbra, 2010.
- [100] C.R. Silva, I. Jardim, C. Collins, C. Airoidi, *Novas Fases Estacionárias à Base de Sílica para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. Química Nova, ISSN 0100-4042, 2004, Vol 27.
- [101] <http://www.quimicasuprema.com/2013/12/o-que-e-cromatografia.html> (Consultado a 3 de abril de 2016).
- [102] http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/datafile/user_27/file/Cuidados%20con%20e%20HPLC.pdf (Consultado a 4 de Abril de 2016).
- [103] http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=451&id=103&option=com_content&task=view (Consultado a 17 de Abril de 2016).
- [104] J. Rodrigues, *Optimização da Incerteza da Determinação, por Cromatografia Iónica, da Composição Maioritária e Vestigial de Soluções Salinas*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências, 2012.

- [105] S. Caldas, F. F. Gonçalves, E. Primel, *et al.* *Principais Técnicas de Preparação de Amostras para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água por Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas*. Química Nova, 2011, vol. 34, p. 1604-1617.
- [106] M. Castilho, F. Ramos, M. I. Noronha da Silveira, *Extração em Fase Fase Sólida (EFS): - Tipos de Enchimento*. Sociedade Portuguesa de Química, 1995
- [107] Macherey-Nagel, Solid Phase Extraction Application Guide.
- [108] I. C. S. Jardim, *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*. Scentia Chromatographica, 2010, vol. 2, p. 13-25.
- [109] Supelco, *Guide to Solid Phase Extration*. Bulletin 910.
- [110] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy of Biological Applications: An Overview*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley & Sons, 2012.
- [111] C. Jung, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Tool to Study Structural Properties of Cytochromes P450 (CYPs)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, vol. 392, p. 1031-1058.
- [112] A. Nascimento, *Quantificação dos Taninos, dos vinhos por Transformada de Fourier dos Espetros no Infravermelho Médio (FTIR)*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto Faculdade de Ciências, 2011.
- [113] C. M. Simonescu, *Application of FTIR Spectroscopy in Environmental Studies*. Intech, 2012, chap. 2, p. 49-84.
- [114] R. Vijayalakshmi, R. Ravindhran, *Comparative Fingerprint and Extraction Yield of Diospyrus ferrea (willd.) Bakh. root with Phenol Compounds (gallic acid), as Determined by Uv-Vis and FT-IR Spectroscopy*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, p. S1367-S1371.
- [115] E. Fiorini, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Medidas para Caracterização e Análise de Materiais, Universidade de Campinas Faculdade de Engenharia Elétrica, 2000.
- [116] Thermo Nicolet™, *Introduction to Fourier Transform Infrared Spetrometry*. 2001.

- [117] L. García-Descalzo, E. García-López, A. Alcázar, *Gel Electrophoresis of Proteins*. Gel Electrophoresis – Principles and Basics, 2012, chap. 5, p. 57-68.
- [118] G. Kavooosi, S. K. Ardestani, *Gel Electrophoresis of Protein – From Basic Science to Practical Approach*. Gel Electrophoresis – Principles and Basics, 2012, chap. 6, p. 69-88.
- [119] GE Healthcare Life Sciences, Amersham™ ECL™ Gel and Gel Box User Manual, 2011.
- [120] A. Khoddami, M. A. Wilkes, T. H. Roberts, *Techniques for Analysis of Plant Phenolics Compounds*. Molecules, 2013, vol. 18, p. 2328-2375.
- [121] J. Dai, R. J. Mumper, *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties*. Molecules, 2010, vol. 15, p. 7313-7352.
- [122] M. Iraldi, V. Samannidou, *et al. Simultaneous Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in Rice Using Solid-Phase Extraction and RP-HPLC with Photodiode Array Detection*. Journal of Separation Science, 2012, Vol. 35, p. 1603-1611.
- [123] J. M. Neves, C. M. Matos, C. G. Moutinho, L. R. Gomes, *Atividade Antioxidante e Avaliação In Vitro da Citotoxicidade de Extratos Aquosos de Folhas de Mentha x Piperita*. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, 2009, vol. 6, p. 344-354.
- [124] A. Cabral, de Oliveira, I. B. Valentim, M. O. Goulart, *et al. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes*. Química Nova, 2009, vol. 32, p. 689-702.
- [125] M. Oktay, I. Gülçin, Ö. Irfan Küfrevioğlu, *Determination of in Vitro Antioxidant Activity of fennel (Foeniculum vulgare) Seed Extracts*. Food Science Technology, 2003, vol. 36, p. 263-271.
- [126] R. Dhandapani, B. Sabna, *Phytochemical Constituents of some Indian Medicinal Plants*. Medical Plants Research Units, 2008, vol. 27, p. 1-8.
- [127] I. R. Maldonade, P. G.B. Carvalho, N. A. Ferreira, *Protocolo para Determinação de Açúcares Totais em Hortaliças pelo Método de DNS*. Embrapa, Comunicado Técnico 85, ISSN 1414-9850.
- [128] A. V. Gusakov, E. G. Kondratyeva, A. P. Sinitsyn, *Comparasion of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities*. International Journal of Analytical Chemistry, 2011, p. 1-4.

- [129] Bio-Rad®, Quick Start™ Bradford Protein Assay - Instruction Manual.
- [130] N. J. Kruger, *The Bradford Method for Protein Quantitation*. Methods in Molecular Biology, Basic Protein and Peptide Protocols, vol. 32, p. 9-15.
- [131] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23200> (Consultado a 26 de outubro de 2015).
- [132] M. M. Bradford, *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry, 1976, vol. 72, p.248-254.
- [133] <https://www.docollab.com/notebook/4729341833379840> (consultado a 3 de novembro de 2015).
- [134] C. Q. Alves, J. M. David, J. P. David, M. V. Bahia, R. M. Aguiar, *Métodos para Determinação de Actividade Antioxidante In Vitro em Substratos Orgânicos*. Química Nova, 2010, vol. 33, p. 2202-2210.
- [135] J. Teixeira, A. Gaspar E. M. Garrido, F. Borges, *Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview*. BioMed Research International, 2013.
- [136] J. Sochor, B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, *et al. Automation of Methods for Determination of Lipid Peroxidation*. Intech, 2012, chap. 6, p. 131-154.
- [137] T. P. A. Devasagayam, K. K. Boloor, T. Ramasarma, *Methods for Estimating Lipid Peroxidation: An analysis of Merits and Demerits*. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2003, vol. 40, p. 300-308.
- [138] A. Aguiar, A. Ferraz, D. Contreras, J. Rodríguez, *Mecanismo e Aplicações da Reação de Fenton Assistida por Compostos Fenólicos Redutores de Ferro*. Química Nova, 2007, vol. 3, p. 623-628.
- [139] Y. Mercier, P. Gatellier, M. Renner, *Lipid and Protein Oxidation In Vitro, and Antioxidant Potential in Meat from Charolais Cows Finished on Pasture or Mixed Diet*. Meat Science, 2004, vol. 66, p. 467-473.
- [140] A. P. M. Loureiro, P. Di Mascio, M. H. G. Medeiros, *Formação de Adutos Exocíclicos com Bases de DNA: Implicações em Mutagênese e Carcinogênese*. Química Nova, 2002, vol. 25, p. 777-793.

- [141] B. Tokur, K. Kormaz, *The Effects of an Iron-Catalyzed Oxidation System on Lipids and Proteins of Dark Muscle Fish*. Food Chemistry, 2007, vol. 104, p. 754-760.
- [142] U. Forstermann, W. C. Sessa, *Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function*. European Heart Journal, 2001, vol. 33, p. 829-837.
- [143] S. S. Sakat, A. R. Juvekar, M. N. Gambhire, *In-vitro Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Methanol Extract of Oxalis corniculata Linn*. International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences, 2010, vol. 2, p. 146-155.
- [144] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, et al. *Cell Viability Assays*. Assay Guidance Manual, 2015.
- [145] F. Denizot, R. Lang, *Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival, Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability*. Journal of Immunological Methods, 1986, vol. 89, P. 271-277.
- [146] M. C. Valadares, N. Cristiana de Castro, L. Carlos da Cunha, *Synadenium Umbellatum: Citotoxicidade e Danos ao DNA de Células da Medula Óssea de Camundongos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007, vol. 43, p. 631-638.
- [147] T. Mosmann, *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. Journal of Immunological Methods, 1983, vol. 65, p. 55-63.
- [148] P. L. Falé, C. Ferreira, F. Maruzzela, et al. *Evaluation of Cholesterol Absorption and Biosynthesis by Decoctions of Annona cherimola Leaves*. Journal of Ethnopharmacology, 2013, vol. 150, p. 718-723.
- [149] Corning, *Transwell® Permeable Supports Selection and Use Guide*. USA, 2013.
- [150] G. Camenisch, J. Alsenz, G. Folkers, *Estimation of Permeability by Passive Diffusion Through Caco-2 Cell Monolayers Using the Drugs' Lipophilicity and Molecular Weight*. European Journal of Pharmaceutical, 1998, vol. 6, p. 313-319.
- [151] R. Castillo, C. Chiriboga, M. Fontanilla, *Standardization of a Model Based on Caco-2 Cell Monolayers with Application on In Vitro Drug Absorption Tests*. Revista Colombiana de Ciências Químico – Farmacêuticas, ISSN 0034-7418, 2006, vol. 35.

- [152] S. Tavarini, E. Degl'Innocenti, D. Remorini, R. Massai, L. Guidi, *Antioxidant Capacity, Ascorbic Acid, Total Phenols and Carotenoids Changes During Harvest and After Storage of Hayward Kiwifruit*. Food Chemistry, 2008, vol. 107, p. 282-288.
- [153] P. Liu, H. Kallio, B. Yang, *Phenolic Compounds in Hawthorn (Crataegus grayana) Fruits and Leaves and Changes During Fruit Ripening*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, vol. 59, p. 11141-11149.
- [154] T. Mahmood, F. Anwar, M. Abbas, N. Saari, *Effect of Maturity on Phenolics (Phenolic Acids and Flavonoids) Profile of Strawberry Cultivars and Mulberry Species from Pakistan*. International Journal of Molecular Science, 2012, vol. 13, p. 4591-4607.
- [155] X. Luo, Q. Huang, *Relationships between Leaf and Stem Soluble Sugar Content and Tuberous Root Starch Accumulation in Cassava*. Journal of Agricultural Science, 2011, vol. 3, p. 64-72.
- [156] L. Prabakaran, V. S. N Murthy, M. Karpakavalli, *Extraction and Characterization of Hibiscus Rosa-Sinensis Leaves Mucilage for Pharmaceutical Applications*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, vol. 1, p. 232-238.
- [157] S. C. Clifford, S.K. Arndt, M. Popp, H. G. Jones, *Mucilages and Polysaccharides in Ziziphus Species (Rhamnaceae): Localization, Composition and Physiological Roles During Drought-stress*. Journal of Experimental Botany, 2001, vol. 53, p. 131-138.
- [158] P. J. Magalhães, J. S. Vieira, L. M. Gonçalves, J. P. Pacheco, *et al. Isolation of Phenolic Compounds from Hop Extracts using Polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by High-Performance Liquid Chromatography- Diode Array Detection- Electrospray Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2010, vol. 1217, p. 3258- 3268.
- [159] W. Huang, H. Zhang, W. Liu, C. Li, *Survey of Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Blueberry, Blackberry, and Strawberry in Nanjing*. Journal of Zhejiang University-Science B, 2012, vol. 13, p. 94-102.
- [160] A. Moure, J. M. Cruz, D. Franco, *et al. Natural Antioxidants from Residual Sources*. Food Chemistry, 2001, vol. 72, p. 145-171.

- [161] S. Singh, S. B. Bothara, *Physico-Chemical and Structural Characterization of Mucilage Isolated from Seeds of Diospyros melonoxylon Roxb.* Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, vol. 50, p. 713-725.
- [162] Faccio C, Machado RAF, De Souza LM, Zoldan SR, Quadri MG (2015) Characterization of the mucilage Eextracted from Jaracatiá (*Carica quercifolia* (A. St. Hil.) Hieron). Carbohydr Polym 131: 370-376.
- [163] A. Brito, J. E. Ramirez, C. Areche, et al. *HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile.* Molecules, 2014, vol. 19, p. 17400-17421.
- [164] L. Yuan, Z. Zhang, Z. Hou, B. Yang, et al. *Rapid Classification and Identification of Complex Chemical Compositions in Traditional Chinese Medicine based on UPLC-Q-TOF/MS coupled with Data Processing Technique using KuDieZi Injection as an Example.* Analytical Method, 201, vol. 7. P. 1-11.
- [165] D. Callemien, S. Collin, *Use of RP-HPLC-ESI(–)-MS/MS to Differentiate Various Proanthocyanidin Isomers in Lager Beer Extracts.* American Society of Brewing Chemistry, 2008.
- [166] R. Jaiswal, L. Jayasinghe, N. Kuhnert, *Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the Rhododendron genus (Ericaceae) by tandem LC–MS.* Journal of Mass Spectrometry, 2012, vol. 47, 502-515.
- [167] G. B. Celli, A. B. Pereira-Netto, T. Beta, *Comparative Analysis of Total Phenolic Content, Antioxidant Activity, and Flavonoids Profile of Fruits from two Varieties of Brazilian cherry (Eugenia uniflora L.) Throughout the Fruit Developmental Stages.* Food Research International, 2011, vol. 44, p. 2442-2451.
- [168] B. D. Davis, *Structural Characterization of Isomeric Flavonoid Glycosides and Metabolites by Metal Complexation and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry.* The University of Texas at Austin, Dissertation, 2007.
- [169] G. Negri, D. Santi, R. Tabach, *Flavonóides Glicosídeos Encontrados no Extrato Hidroalcoólico de Tilia cordata, Espécie usada como Ansiolítico.* Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 2013, vol. 15, p. 217-224.

- [170] L. A. Tiberi, J. H. Yariwake, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *On-Line LC/UV/MS Analysis of Flavonols in the Three Apple Varieties Most Widely*. Journal of Brazilian Chemical Society, 2007, vol. 18, p. 100-105.
- [171] J. Gao, J. Shi, X. Lu, C. Sun, Y. Pan, *Differentiation of Common Diastereoisomeric Ursane-Type Triterpenoids by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011, vol. 25, p. 1349-1355.
- [172] O. S. Nimmi, P. George, *Evaluation of the Antioxidant Potencial of a Newly Developed Polyherbal Formulation for Antiobesity*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012, vol. 4, p. 505-510.
- [173] F. Boora, E. Chirisa, S. Mukanganyama, *Evaluation of Nitrite Radical Scavenging Properties of Selected Zimbabwean Plant Extracts and their Phytoconstituents*. Journal of Food Processing, 2014, p. 1-7.
- [174] F. M. Awah, A. W. Verla, *Antioxidant Activity, Nitric Oxide Scavenging Activity and Phenolic Contents of Ocimum gratissimum Leaf Extract*. Journal of Medicinal Plants Research, 2010, vol. 4, p. 2479-2487.
- [175] R. Oonsivilai, M. G. Ferruzi, S. Ninganond, *Antioxidant Activity and Citotoxicity of rang chuet (thunbergia laurifolia Lindl.) Extracts*. Asian Journal of Food and Agro-Industry, 2008, vol. 1, p. 116-128.
- [176] H. Rastogi, S. Jana, *Evaluation of Physicochemical Properties and Intestinal Permeability of six Dietary Polyphenols in Human Intestinal Colon Adenocarcinoma Caco-2 Cells*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2014, vol. 5.
- [177] Y. Zheng, *In Vitro Studies on the Intestinal Absorption Mechanisms of Quercetin and Related Glycosides*. The Chinese University of Hong Kong, 2001.
- [178] M. D'Archivio, C. Filesi, R. Vari, B. Scazzocchio, R. Masella, *Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies*. International Journal of Molecular Sciences, 2010, vol. 11, p. 1321-1342.
- [179] T. Bohn, *Dietary Factors Affecting Polyphenol Bioavailability*. Nutrition Reviews, p.1-24.

- [180] M. Tamura, H. Nakagawa, T. Tsushida, K. Hirayama, K. Itoh, *Effect of Pectin Enhancement on Plasma Quercetin and Fecal Flora in Rutin-Supplemented Mice*. Journal of Food Science, 2007, vol. 72, p. S648-51.